



Miguel Augusto Rosa Moreira

Licenciatura em Química Aplicada

Bionanoconjugados Catalíticos de Tirosinase e Nanopartículas de Ouro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Professor Doutor Ricardo Franco, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares

Arguente: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2014

Miguel Augusto Rosa Moreira

Licenciatura em Química Aplicada

**Bionanoconjugados Catalíticos de
Tirosinase e Nanopartículas de Ouro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Professor Doutor Ricardo Franco, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Arguente: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira
Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

Setembro 2014

Bionanoconjugados Catalíticos de Tirosinase e Nanopartículas de Ouro

Copyright ©2014

Miguel Augusto Rosa Moreira

Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à minha Mãe, pessoa sem a qual nada seria possível e que com todos os seus sacrifícios me permite chegar a este ponto da minha vida académica e por tudo o que sempre me deu. Ao meu pai, cuja memória levarei sempre comigo. À minha irmã pela sua amizade e ajuda desde sempre. À Susana Reis por ter sido bastante importante para mim nestes últimos dois anos e sem a qual terminar este percurso teria sido bastante mais difícil e não teria sido a mesma coisa.

A realização da dissertação marca o finalizar de uma etapa marcada por trabalho árduo. Gostaria de agradecer ao professor Ricardo Franco pela sua disponibilidade, orientação e por me ter aceitado no seu laboratório para a realização deste trabalho.

A todas as minhas colegas do laboratório 603, um muito obrigado pela ajuda, por me terem ouvido sempre que precisei e por momentos bem passados ao longo de um ano de trabalho.

Um muito obrigado à Dr^a Susana Sousa do REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela gentileza de ter efetuado a síntese de algumas nanopartículas de ouro usadas neste trabalho.

Resumo

O presente estudo teve como principal objetivo a preparação de bionanoconjugados de Tirosinase e nanopartículas de ouro (AuNPs) com a finalidade de observar alterações positivas da atividade enzimática relativamente à enzima livre em solução, a partir da determinação dos respetivos parâmetros cinéticos.

A atividade específica da tirosinase foi determinada com tirosina, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e 4-metilcatecol, tendo este último sido escolhido como substrato a utilizar no decorrer do restante trabalho experimental devido ao maior número de unidades específicas determinado para este substrato, bem como devido à menor concentração de enzima necessária para a realização dos ensaios.

Os ensaios cinéticos com variação da temperatura e pH permitiram concluir que a 30 °C e a pH 6,5 a tirosinase é mais ativa.

Os bionanoconjugados foram preparados incubando tirosinase de um dia para o outro com AuNPs. Três diferentes agentes de revestimento foram usados nos estudos: AuNPs sintetizadas revestidas por citrato, funcionalizadas com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e funcionalizadas com pentapéptido CALNN. Diferentes razões molares de tirosinase : AuNPs foram estudadas e, apesar da baixa reprodutibilidade dos resultados, os mais consistentes foram obtidos para a razão molar de 120. A conjugação da tirosinase com AuNPs aumentou a afinidade para o substrato e também a eficiência catalítica, em todos os bionanoconjugados, sendo que os melhores resultados foram observados para AuNPs funcionalizadas com CALNN, aumentando cerca de 48% a eficiência catalítica relativamente à tirosinase na sua forma livre em solução. As AuNPs funcionalizadas com citrato apresentaram maior consistência de resultados relativamente ao aumento da velocidade inicial da reacção.

A modelação computacional da tirosinase a pH 6,5 revelou que a carga superficial da enzima é maioritariamente negativa, dificultando a adsorção na superfície das AuNPs, podendo esta ocorrer em regiões de maior carga positiva localizadas na subunidade L ou englobando regiões da subunidade H.

Palavras-chave: Tirosinase, Nanopartículas de Ouro, Bionanoconjugados, Atividade Enzimática

Abstract

The main objective of the work presented was the preparation of bionanoconjugates of tyrosinase and gold nanoparticles (AuNPs) with the purpose of improving the enzymatic activity of the enzyme and the determination of the respective kinetic parameters.

Tyrosinase specific activity was determined with tyrosine, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and 4-methylcatechol. Due to less concentration of enzyme and substrate needed for the assays as well as higher tyrosinase specific activity, 4-methylcatechol was chosen as the substrate.

Kinetic assays at different temperatures and with solutions at different pH showed that tyrosinase was most active at 30 °C and pH 6.5.

The bionanoconjugates were prepared by overnight incubation of the enzyme with the three different functionalized AuNPs: citrate capped, 11-mercaptopundecanoic acid (MUA) capped and CALNN capped AuNPs. Various molar ratios of tyrosinase : AuNPs were studied with the most consistent results being observed for molar ratio 120, despite the remaining results showing low reproducibility. At this ratio, improved substrate affinity and catalytic efficiency were observed for all the bionanoconjugates, in particular for conjugates with CALNN capped AuNPs which showed 48 % improved catalytic efficiency when compared with the free enzyme. The comparison of the initial rate of the reaction for the free tyrosinase and the three bionanoconjugates showed better consistency of results and enhanced initial rate for bionanoconjugates with citrate capped AuNPs.

The computational study of the electrostatic potential of the tyrosinase at pH 6.5 showed that the enzyme surface is mostly negatively charged difficulting the adsorption on the surface of the AuNPs. The positive electrostatic potential of both subunits L and center region of the enzyme, encompassing the subunit H, indicates that the adsorption should occur in these regions.

Keywords: Tyrosinase, Gold Nanoparticles, Bionanoconjugates, Enzymatic activity

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Índice.....	xi
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tabelas.....	xvii
Lista de abreviaturas.....	xix
Capítulo I: Introdução	1
1.1 Bionanotecnologia.....	3
1.2 Nanopartículas de ouro.....	4
1.2.1 Funcionalização de AuNPs	6
1.2.2 AuNPs como suporte de imobilização para biomoléculas	8
1.2.3 Aplicações para Bionanoconjugados.....	10
1.3 Tirosinase	13
1.3.1 Tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i>	15
1.3.2 Caracterização da Tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i>	16
1.3.3 Centro ativo da tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i>	18
1.3.4 Estudos cinéticos com tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i>	21
1.3.5 Aplicações para tirosinase	22
1.4 Técnicas.....	24
1.4.1 Espectroscopia de Ultravioleta/Vísivel (UV/Vís)	24
1.4.2 Electroforese.....	25
1.4.2.1 Electroforese em gel de agarose	25
1.4.3 Cinética enzimática	25
Capítulo II: Procedimentos experimentais	29
2.1 Instrumentação	31
2.2 Materiais e reagentes	31
2.3 Procedimentos experimentais.....	33
2.3.1 Caracterização da Tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i>	33
2.3.1.1 Determinação de unidades específicas de enzima	33
2.3.1.2 Determinação da concentração do preparado enzimático	33

2.3.3 Determinação do comprimento de onda para ensaios cinéticos	34
2.3.2 Determinação da temperatura ótima.....	34
2.3.3 Determinação de pH ótimo.....	35
2.3.3 Determinação do coeficiente de extinção molar do produto formado.....	35
2.3.4 Ensaios cinéticos com Tirosinase.....	36
2.3.5 Síntese de Nanopartículas de Ouro.....	36
2.3.6 Caracterização das Nanopartículas de Ouro	37
2.3.7 Funcionalização das Nanopartículas de Ouro	38
2.3.8 Preparação dos bionanoconjugados.....	38
2.3.9 Estudos cinéticos com bionanoconjugados	39
2.3.10 Electroforese em gel de agarose	39
Capítulo III: Apresentação e discussão dos resultados.....	41
3.1 Tirosinase livre	43
3.1.1 Determinação da concentração de proteína total	43
3.1.2 Determinação da atividade enzimática	44
3.1.3 Determinação do coeficiente de extinção molar de 4-metilcatecol	53
3.1.4 Otimização das condições experimentais	55
3.1.4.1 Oxigenação da solução de substrato.....	55
3.1.4.2 Determinação do pH ótimo de funcionamento de tirosinase.....	57
3.1.4.3 Determinação da temperatura ótima de funcionamento de tirosinase	60
3.1.5 Ensaios cinéticos	62
3.2 Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Ouro	64
3.2.2 Funcionalização	65
3.3 Bionanoconjugados	66
3.3.1 Ensaios e determinação de parâmetros cinéticos.....	66
3.3.2 Comparação entre velocidades iniciais das reações	75
3.3.3 Simulação computacional da Tirosinase a pH 6,5.....	78
3.3.4 Electroforese em gel de agarose	80
Capítulo IV: Conclusões	83
4.1 Conclusões	85
Capítulo V: Perspetivas futuras	89
5.1 Perspetivas Futuras.....	91
Bibliografia.....	93
Apêndice.....	101

Lista de figuras

Figura 1.1- Imagens TEM de (a) 15 nm, (b) 31 nm, (c) 69 nm, (d) 121 nm, (e) 151 nm e imagem SEM de (f) 294 nm de Nanopartículas de ouro. A escala corresponde a 200 nm nas imagens a-c e 500 nm para as imagens d-f ^[10]	4
Figura 1.2 – Caracterização de soluções de AuNPs. Na esquerda: soluções de AuNPs, a vermelho dispersão coloidal, a azul solução agregada ^[19] ; na direita: espectro típico de absorção de AuNP com desvio do comprimento de onda do máximo de absorção característico das AuNPs, com o aumento do diâmetro das mesmas, devido ao estado agregado ^[20]	5
Figura 1.3 - Representação da oscilação de electrões que origina o fenómeno de SPR ^[26]	6
Figura 1.4 – Estrutura de possíveis agentes de revestimento de AuNPs. Em cima: estrutura da molécula MUA ^[8] ; em baixo: estrutura do péptido CALNN ^[30]	8
Figura 1.5- Estratégias de formação de bionanoconjugados. De cima para baixo: ligação covalente a AuNP; adsorção eletroestática a AuNP; ligação específica de antígeno a AuNP funcionalizada com respetivo anticorpo ^[33]	9
Figura 1.6 – Esquema de um eléctrodo coberto com AuNPs ligadas covalentemente a glucose oxidase (GOx) para a deteção de glucose ^[45]	11
Figura 1.7 - Reação de monofenolase catalisada por Tirosinase (desenho efetuado recorrendo ao <i>software ChemDraw</i> ^[60]).....	13
Figura 1.8 - Reação de difenolase, catalisada por Tirosinase (desenho efetuado recorrendo ao <i>software ChemDraw</i> ^[60]).....	14
Figura 1.9 - Reação de oxidação de 4MC, catalisada por Tirosinase (desenho efetuado recorrendo ao <i>software ChemDraw</i> ^[60]).....	14
Figura 1.10 - Modelo tridimensional da estrutura da enzima tirosinase (código PDB : 2Y9W ^[59]). As subunidades H encontram-se coloridas de azul claro e escuro. As subunidades L encontram-se coloridas a vermelho e amarelo. Imagem produzida recorrendo ao <i>software Chimera</i> ^[77]	18
Figura 1.11- Representação do centro ativo da tirosinase na subunidade H. (código PDB: 2Y9W ^[59]). Imagem produzida recorrendo ao <i>software Chimera</i> ^[77] . Observam-se a laranja os átomos de cobre, cada um coordenado por três Histidinas, e uma molécula de água formando pontes de hidrogénio entre os dois átomos de cobre.....	19
Figura 1.12 – À esquerda: as diferentes formas da tirosinase (de cima para baixo): forma <i>oxi</i> , forma <i>met</i> e forma <i>desoxi</i> ^[69] ; à direita: oxidação de fenóis e catecóis por <i>oxi</i> -tirosinase ^[78]	20
Figura 1.13 – Representação gráfica de uma curva típica de cinética <i>Michaelis-Menten</i> , da qual podem ser determinados parâmetros K_m e V_{max} ^[103]	26
Figura 3.1- Recta de calibração para o ensaio de determinação da concentração de proteína total pelo método de BCA.....	43
Figura 3.2 – Ensaio efetuados para a determinação da atividade específica das diferentes soluções de tirosinase, utilizando tirosina como substrato e sem oxigenação da solução antes do início do ensaio.....	45
Figura 3.3- Ensaio efetuados para a determinação da atividade específica das diferentes soluções de tirosinase, utilizando tirosina como substrato e com oxigenação da solução antes do início do ensaio.....	45
Figura 3.4- Ensaio efetuados para a determinação da atividade específica das diferentes soluções de tirosinase, utilizando L-DOPA como substrato.....	47

Figura 3.5- Ensaios efetuados para a determinação da atividade específica das diferentes soluções de tirosinase, utilizando 4-metilcatecol como substrato.....	48
Figura 3.6 – Ensaios para a determinação da atividade específica de tirosinase, efetuando três diferentes diluições da alíquota C e utilizando L-DOPA como substrato.	49
Figura 3.7- Variação da atividade específica da tirosinase com a diluição da solução utilizada. L-DOPA foi usado como substrato nos ensaios.	50
Figura 3.8- Ensaios para a determinação da atividade específica de tirosinase, efetuando três diferentes diluições da alíquota C e utilizando 4-metilcatecol como substrato.	50
Figura 3.9- Variação da atividade específica da tirosinase com a diluição da solução utilizada. 4-metilcatecol foi usado como substrato nos ensaios.	51
Figura 3.10 – Ensaios para a determinação da atividade específica de tirosinase, efetuando nove diferentes diluições da alíquota C e utilizando 4-metilcatecol como substrato.	51
Figura 3.11 – Variação da atividade específica da tirosinase com a diluição da solução utilizada. 4-metilcatecol foi usado como substrato nos ensaios e foram efetuadas nove diferentes diluições da alíquota C de tirosinase.	52
Figura 3.12 – Espectros obtidos para a reação de oxidação de 4-metilcatecol com formação de 4-metil- <i>o</i> -benzoquinona. Espectros obtidos de 10 em 10 segundos até não ocorrer alteração do máximo de absorção a 400 nm.	53
Figura 3.13- Representação dos valores de absorvância a 400 nm em função de diferentes valores de concentração de substrato convertido a produto, a pH 7.	54
Figura 3.14- Linearização dos valores de absorvância a 400 nm em função de diferentes valores de concentração de substrato convertido a produto, a pH 6,5.	55
Figura 3.15 – Reações de oxidação de 4-metilcatecol com e sem oxigenação da solução reacional, seguindo a formação de produto ao comprimento de onda de 400 nm.	56
Figura 3.16 – Ensaios para a determinação da atividade específica da tirosinase nas reações de oxidação de 4-metilcatecol, com e sem oxigenação da solução reacional.	57
Figura 3.17 – Aspeto das diferentes soluções de 4-metilcatecol após 10 horas após a sua respectiva preparação. O valor de pH entre cada solução preparada é de 0,5.	58
Figura 3.18 – Espectros normalizados das soluções de 4-metilcatecol a diferentes valores de pH, realizados imediatamente após a preparação da respetiva solução.	58
Figura 3.19- Espectros normalizados das soluções de 4-metilcatecol a diferentes valores de pH, realizados 24 horas após a preparação da respetiva solução.	59
Figura 3.20 – Valores de velocidade inicial da reação de oxidação de 4-metilcatecol em função do valor de pH da respetiva solução, para a determinação do pH ótimo de actividade da tirosinase. Ensaios realizados a 25 °C e com concentração final de substrato 167 µM.	60
Figura 3.21- Valores de velocidade inicial da reação de oxidação de 4-metilcatecol em função do valor de temperatura do respetivo ensaio, para a determinação de temperatura ótima de atividade da tirosinase. Ensaios realizados com concentração final de substrato 167 µM. A azul encontram-se os ensaios efetuados com solução de tampão fosfato a pH 7; a vermelho encontram-se os ensaios efetuados com mistura de soluções tampão a pH 6,5.	61
Figura 3.22 – Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função do respetivo valor de concentração de substrato. A azul encontram-se representados os valores experimentais; a vermelho encontra-se representado o ajuste não linear dos valores experimentais efectuado recorrendo à ferramenta <i>Solver</i>	63
Figura 3.23- Espectro UV/Vís. da solução de AuNPs sintetizadas pelo método de <i>Turkevich</i> com redução por citrato, realizado com diluição 1 : 5, apresentando o máximo de absorção característico a 520 nm.	64

Figura 3.24 – Espectros UV-Vís. das soluções de AuNPs, realizados com diluição 1: 5. A: espectro da solução de AuNPs sintetizadas (a azul) e espectro após a funcionalização com MUA (a vermelho); B: espectro da solução de AuNPs sintetizadas (a azul) e espectro após a funcionalização com CALN (a verde); C: sobreposição dos espectros das diferentes AuNPs onde se observa desvio do máximo de absorção característico após funcionalização.	65
Figura 3.25 – Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta <i>Solver</i> . A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 50.	68
Figura 3.26 - Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta <i>Solver</i> . A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 75.	69
Figura 3.27 - Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta <i>Solver</i> . A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 10; a roxo: ensaios com BNC-MUA de razão molar 10; a verde: ensaios com BNC-CALNN de razão molar 10.	70
Figura 3.28 - Representação dos valores de velocidade inicial das reacções de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta <i>Solver</i> . A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 120; a roxo: ensaios com BNC-MUA de razão molar 120; a verde: ensaios com BNC-CALNN de razão molar 120.	72
Figura 3.29 – Representação do aumento de eficiência catalítica determinada nos BNCs de razão molar 120 comparativamente com tirosinase livre em solução.	73
Figura 3.30 – Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta <i>Solver</i> . A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 350; a roxo: ensaios com BNC-MUA de razão molar 350; a verde: ensaios com BNC-CALNN de razão molar 350.	74
Figura 3.31 – Representação da percentagem de aumento de velocidade inicial da reacção de oxidação de 200 μ M de 4-metilcatecol observado para os BNCs de diferentes razões molares, relativamente velocidade inicial de reacção determinada para a tirosinase livre em solução. A concentração de tirosinase foi igual em todos os ensaios (320 nM).	76
Figura 3.32 - Representação da percentagem de aumento de velocidade inicial da reacção de oxidação de 200 μ M de 4-metilcatecol observado para os BNCs de razão molar 120, relativamente velocidade inicial de reacção determinada para a tirosinase livre em solução.	77
Figura 3.33 - Representação da percentagem de aumento de velocidade inicial da reacção de oxidação de 200 μ M de 4-metilcatecol observado para os diferentes BNCs de razão molar 120, relativamente velocidade inicial de reacção determinada para a tirosinase livre em solução. Concentração de tirosinase no ensaio 1 - 120 nM; ensaio 2 – 320 nM; ensaio 3 – 167 nM.	77

Figura 3.34- Imagem frontal da estrutura tridimensional da enzima tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> , com base na estrutura cristalográfica depositada com o código PDB 2y9w. A imagem foi preparada utilizando o <i>software Chimera</i> ^[77]	79
Figura 3.35- Imagem da estrutura tridimensional da enzima tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> vista por trás, com base na estrutura cristalográfica depositada com o código PDB 2y9w. A imagem foi preparada utilizando o <i>software Chimera</i> ^[77] . Encontra-se representada por setas, a região da subunidade L pela qual pode ocorrer adsorção à superfície das AuNPs. Representada por um círculo encontra-se a região, que engloba zonas da subunidade H, pela qual poderá ocorrer também adsorção à superfície das AuNPs.	80
Figura 3.36 – Electroforese em gel de agarose para BNC-Cit; a tabela na direita mostra a razão molar, entre tirosinase e AuNP-Cit, dos BNC depositados em cada poço.	81
Figura 3.37 – Electroforese em gel de agarose para BNC-CALNN; a tabela na direita mostra a razão molar, entre tirosinase e AuNP-CALNN, dos BNC depositados em cada poço.	81
Figura 3.38- Electroforese em gel de agarose para BNC-MUA; a tabela na direita mostra a razão molar, entre tirosinase e AuNP-MUA, dos BNC depositados em cada poço.	82
Figura 5.1- Reta de calibração para determinação de proteína pelo método de BCA.....	106
Figura 5.2- Imagem frontal da estrutura tridimensional da enzima tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> , com base na estrutura cristalográfica depositada com o código PDB 2y9w. A imagem foi preparada utilizando o <i>software Chimera</i> ^[77] e utilizando a ferramenta APBS ^[111] para colorir a superfície.	107
Figura 5.3- Imagem da estrutura tridimensional da enzima tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> vista por trás, com base na estrutura cristalográfica depositada com o código PDB 2y9w. A imagem foi preparada utilizando o <i>software Chimera</i> ^[77] e utilizando a ferramenta APBS ^[111] para colorir a superfície.	107

Lista de tabelas

Tabela 3.1- Valores de concentração das diferentes soluções de tirosinase determinados nas várias amostras preparadas.	44
Tabela 3.2 – Atividade específica das diferentes soluções preparadas de tirosinase determinadas utilizando tirosina como substrato.....	46
Tabela 3.3- Atividade específica das diferentes soluções preparadas de tirosinase determinadas utilizando DOPA como substrato.....	47
Tabela 3.4 – Atividade específica das diferentes soluções preparadas de tirosinase determinadas utilizando 4-metilcatecol como substrato.....	48
Tabela 3.5 – Valores de velocidade inicial para as reações de oxidação de 4-metilcatecol, com e sem oxigenação da solução reacional.	56
Tabela 3.6 – Atividade específica da tirosinase determinada para as reações de oxidação de 4-metilcatecol, com e sem oxigenação da solução reaccional.....	57
Tabela 3.7- Parâmetros cinéticos da tirosinase calculados para a reação de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.	63
Tabela 3.8- Comprimento de onda do máximo de absorção característico das diferentes AuNPs	66
Tabela 3.9 – Valores de velocidade inicial das reacções de oxidação de 4-metilcatecol, efetuando um passo de lavagem do BNC, centrifugando e ressuspensando no mesmo volume de solução inicial. Os ensaios foram realizados com BNC lavado e com o sobrenadante obtido no processo.	67
Tabela 3.10- Parâmetros cinéticos de tirosinase livre e de BNC-Cit (razão molar 50) calculados para a reacção de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.	68
Tabela 3.11- Parâmetros cinéticos de tirosinase livre e de BNC-Cit (razão molar 75) calculados para a reacção de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.	69
Tabela 3.12- Parâmetros cinéticos de tirosinase livre, BNC-Cit (razão molar 10), BNC-MUA (razão molar 10) e de BNC-CALNN (razão molar 10), calculados para a reação de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.....	71
Tabela 3.13- Parâmetros cinéticos de tirosinase livre, BNC-Cit (razão molar 120), BNC-MUA (razão molar 120) e de BNC-CALNN (razão molar 120), calculados para a reação de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.....	72
Tabela 3.14- Parâmetros cinéticos de tirosinase livre, BNC-Cit (razão molar 350), BNC-MUA (razão molar 350) e de BNC-CALNN (razão molar 350), calculados para a reação de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.....	74
Tabela 5.1 – Valores de absorvância e concentração da nova solução <i>stock</i> de tirosinase.	107

Lista de abreviaturas

AuNP – Nanopartículas de ouro

CALNN – Pentapéptido de cisteína, alanina, leucina, aspargina, aspargina

Cit - Citrato

MUA – Ácido 11-Mercaptoundecanóico

AuNP-CALNN - Nanopartículas de ouro funcionalizadas com o pentapéptido CALNN

AuNP-Cit - Nanopartículas de ouro funcionalizadas com citrato

AuNP-MUA - Nanopartículas de ouro funcionalizadas com Ácido 11-Mercaptoundecanóico

BNC - Bionanoconjugado

BNC-CALNN – Bionanoconjugado com Nanopartículas de ouro funcionalizadas com o pentapéptido CALNN

BNC-Cit - Bionanoconjugado com Nanopartículas de ouro funcionalizadas com citrato

BNC-MUA - Bionanoconjugado com Nanopartículas de ouro funcionalizadas com Ácido 11-Mercaptoundecanóico

4MC – 4-Metilcatecol

L-DOPA – L-3,4-dihidroxifenilalanina

SDS – Dodecil sulfato de sódio

DLS – Dispersão de luz dinâmica

BCA – Ácido bicinconínico

BSA – Albumina de soro bovino

SPR – Ressonância plasmônica de superfície

SAM – Monocamadas automontadas

EDC - 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

NHS - N-Hidroxisuccinamida

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão

SEM - Microscopia eletrônica de varrimento

Capítulo I: Introdução

1.1 Bionanotecnologia

A Bionanotecnologia tem vindo a ganhar uma importância acrescida nos últimos anos. A importância crescente desta área multidisciplinar fica-se a dever ao grande desenvolvimento tecnológico que se tem vindo a verificar ao longo das últimas décadas, e em particular na última ^[1].

A nanotecnologia pode ser definida como sendo a possibilidade de construção, desenvolvimento e manipulação de sistemas funcionais à escala molecular, ou seja, estruturas ou partículas menores que 100 nm ^[2]. O facto de à nano escala ser possível o fabrico de materiais com novas propriedades (magnéticas, óticas, elétricas) dependentes da sua forma e tamanho, faz com que a nanotecnologia surja como um parceiro natural à área da biologia. Ao conjugar estes materiais com moléculas ou estruturas biológicas, podem então ser adicionadas novas funcionalidades aos mesmos (bionanoconjugados). Estes materiais apresentam também a vantagem do baixo custo de fabrico, bem como do seu tamanho ser idêntico a estruturas e moléculas biológicas, sendo portanto bastante adequados para aplicações e investigação *in vivo* e *in vitro* ^[2].

A possibilidade de conjugar a biologia com a nanotecnologia oferece então a possibilidade bastante interessante, e relevante, da aplicação de biomoléculas como DNA e proteínas, com toda a sua complexidade inerente, ao nível da nanoescala. A junção das áreas da biologia e nanotecnologia permite a síntese, modificação química e montagem de novos materiais, estruturas e sistemas com grande controlo sobre a forma e tamanho das mesmas ^[3]. Além do maior controlo sobre a síntese destes bionanoconjugados, é agora também possível uma caracterização mais detalhada dos mesmos, devido ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de um grande número de aparelhos e técnicas, associados a este desenvolvimento recente da nanotecnologia.

Estes bionanoconjugados podem ter diversas aplicações em várias áreas desde investigação em ciência e medicina até indústrias como farmacêutica, alimentar e cosmética ^[4-6], bem como para a produção de biomateriais ^[7], sendo que esta última aplicação torna-se importante nos dias que correm devido à crescente preocupação com o meio ambiente e consequente redução do impacto ambiental destes nanomateriais.

Como principais aplicações, estes bionanoconjugados são, não só utilizados para terapia e diagnóstico ^[8], mas também no desenvolvimento de biossensores ^[9]. Nestes casos, o nanomaterial (por exemplo nanopartículas metálicas) é conjugado com DNA, anticorpo ou enzima de interesse de modo a ser então administrado conforme a aplicação pretendida. Outra aplicação emergente para estes nanomateriais é a conjugação com fármacos para transporte e entrega dirigida dos mesmos ^[2]. Apesar destas diversas aplicações, a investigação na área da bionanotecnologia encontra-se ainda a dar os

primeiros passos. Apesar de ainda poucos produtos derivados da bionanotecnologia se encontrarem em uso clínico, é uma área que apresenta potencial para o desenvolvimento de produtos que permitam o diagnóstico, monitorização e tratamento de várias doenças como cancro e Alzheimer, entre outras ^[2].

1.2 Nanopartículas de ouro

Devido às suas características únicas, distintas do material que as origina, as nanopartículas metálicas têm sido alvo de estudo durante os últimos anos. Estas nanopartículas apresentam geralmente uma forma esférica e diâmetros variáveis. Além da forma esférica, podem também apresentar diversas outras formas dependendo esta do método de síntese utilizado ^[10]. As nanopartículas consistem geralmente numa suspensão coloidal, normalmente ouro ou prata (podendo também ser óxido de ferro ou platina) ^[11,12] e cujas propriedades, diferem como já referido atrás, das do material que as origina. Além do interesse que suscitam na área de investigação, são também utilizadas em muitos dos produtos comercializáveis de dia-a-dia, desde pensos rápidos, com efeito antimicrobiano (nanopartículas de prata), a cremes e produtos de beleza, entre outros ^[13-16].

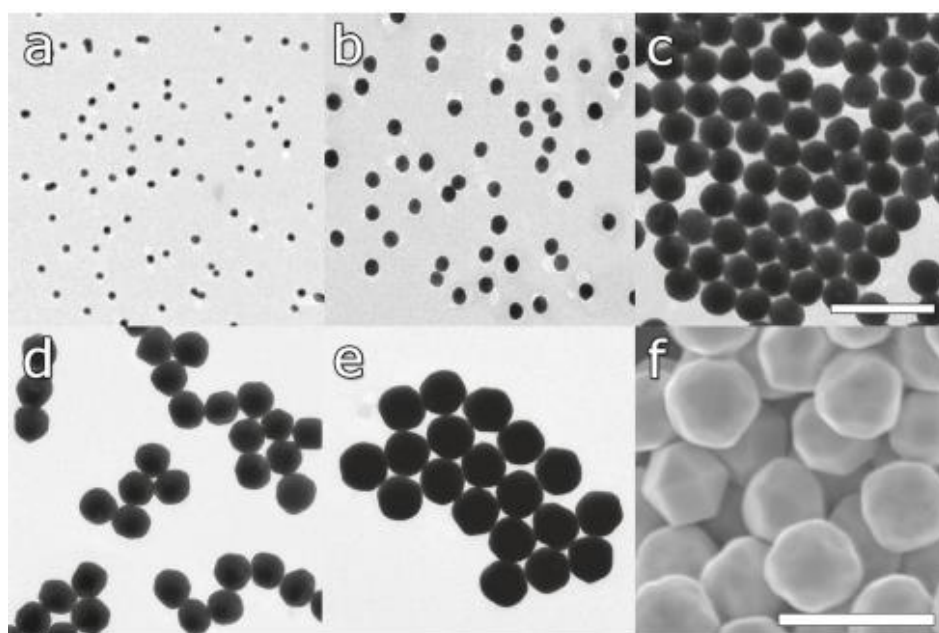


Figura 1.1 - Imagens TEM de (a) 15 nm, (b) 31 nm, (c) 69 nm, (d) 121 nm, (e) 151 nm e imagem SEM de (f) 294 nm de Nanopartículas de ouro. A escala corresponde a 200 nm nas imagens a-c e 500 nm para as imagens d-f ^[10].

As nanopartículas de ouro (AuNPs), em foco neste trabalho, podem ser sintetizadas recorrendo a métodos diferentes. Para a síntese de AuNPs de forma esférica, é seguido normalmente o protocolo publicado por Turkevich et al ^[17,18]. Neste procedimento, uma solução aquosa de ouro (ácido tetracloroáurico) é reduzida pela adição de citrato de sódio. O citrato não só reduz o ouro, que se encontra sob a forma de Au (III) a Au (0), como também confere estabilidade às nanopartículas formadas, atuando como agente de revestimento, recobrando a superfície das mesmas. Por este motivo, o tamanho final das nanopartículas dependerá da concentração de citrato na solução adicionada ou do número de passos de redução efectuados durante a síntese. No fim da síntese apresentam uma coloração vermelha devido à banda de SPR (ressonância plasmónica de superfície), característica das mesmas. O comprimento de onda máximo desta banda SPR varia desde cerca de 520 nm, para as AuNPs com cerca de 15 nm de diâmetro, até cerca de 641 nm para AuNPs de 300 nm ^[10].

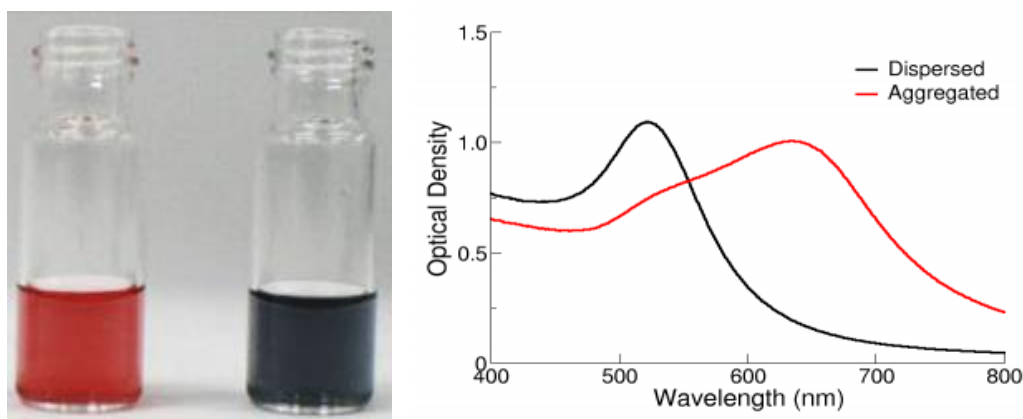


Figura 1.2 – Caracterização de soluções de AuNPs. Na esquerda: soluções de AuNPs, a vermelho dispersão coloidal, a azul solução agregada ^[19]; na direita: espectro típico de absorção de AuNP com desvio do comprimento de onda do máximo de absorção característico das AuNPs, com o aumento do diâmetro das mesmas, devido ao estado agregado ^[20]

A existência do máximo de absorção característico das nanopartículas, e consequente cor da solução coloidal, deve-se à ocorrência de um fenómeno electromagnético conhecido por ressonância plasmónica de superfície, ou SPR. Este efeito ocorre quando a radiação electromagnética incide na superfície metálica das nanopartículas, levando a que ocorra oscilação coletiva dos eletrões, quando são excitados a comprimentos de onda específicos, resultando em maior intensidade de radiação absorvida e dispersa ^[20]. A oscilação dos eletrões induz a formação de um dipolo na nanopartícula, levando a que ocorra uma frequência de ressonância única dentro da nanopartícula, de modo a compensar este efeito ^[21]. O comprimento de onda a que este efeito ocorre é dependente do meio, tamanho e forma da nanopartícula ^[21]. A análise do espectro de absorção pode ser útil para inferir qual o estado de agregação das nanopartículas, através de um desvio no máximo de absorção ^[22], ou da

existência de dispersão de tamanhos, observado pelo alargamento da banda SPR. Soluções de AuNPs esféricas agregadas, ou seja, com pouca estabilidade, deixam de evidenciar a coloração típica avermelhada, passando a ser observável uma solução de cor azul, associada ao desvio da banda SPR para o vermelho, para comprimentos de onda acima de 600 nm ^[23,24]. Soluções de força iônica elevada levam à agregação de nanopartículas, assim como pH bastante ácido, pois anulam o efeito de repulsão entre estas que lhes é conferido pelo agente de revestimento, citrato, que confere carga superficial negativa às AuNPs ^[24,25].

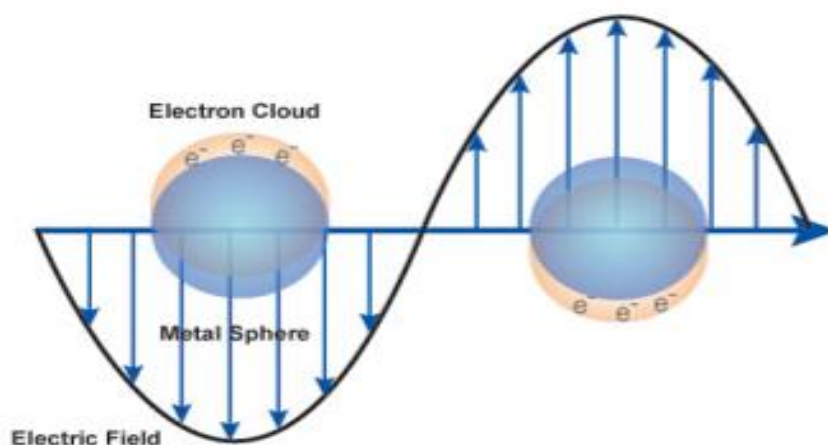


Figura 1.3 - Representação da oscilação de electrões que origina o fenómeno de SPR ^[26]

1.2.1 Funcionalização de AuNPs

Outra das particularidades das AuNPs é a possível funcionalização das superfícies das mesmas com diferentes grupos funcionais. Um dos fatores mais importantes das soluções coloidais de AuNPs é a sua estabilidade. Como já referido atrás, após a síntese, a superfície da nanopartícula encontrar-se-á coberta por um agente de revestimento. O revestimento depende maioritariamente no material utilizado para a síntese das nanopartículas e do solvente utilizado. Apesar do mais comum ser citrato, outros revestimentos podem ser utilizados como β -ciclodextrina, CTAB, quitosano ^[27, 28], entre outros. A função do revestimento é, não só, impedir a agregação entre diferentes nanopartículas, garantindo maior estabilidade no sistema coloidal, mas também controlar o crescimento da nanopartícula durante a síntese ^[29], impedindo que mais núcleos do metal se juntem na fase de crescimento. A escolha do agente de capping é importante, não só para as propriedades finais das nanopartículas, mas também

para o posterior manuseamento das mesmas como purificação, separação de tamanhos e funcionalização^[8]. Poderá ser escolhido um revestimento que favoreça a solubilidade em meio aquoso (hidrofílico), apropriado para uso em sistemas biológicos, ou em meio orgânico (hidrofóbico)^[8], dependendo da aplicação pretendida para as nanopartículas. A adsorção do agente de revestimento pode ocorrer por interações electroestáticas ou hidrofóbicas. Este processo é dinâmico e reversível, sendo possível remover ou trocar o revestimento, por adição de outro revestimento ou através de passos de lavagem^[8].

O agente de revestimento deve ter uma alta afinidade para a nanopartícula e cobrir a sua superfície, de modo a formar uma monocamada densa à sua volta^[8]. A presença insuficiente de agente de revestimento à superfície das nanopartículas leva à agregação das mesmas. A estabilidade é garantida através de repulsões eletroestáticas, visto que a carga superficial das AuNPs é aproximadamente a mesma, em cada uma delas. Como tal, o revestimento é bastante sensível à força iónica e, adicionalmente, as nanopartículas podem apenas ser solúveis numa certa gama de pH, devido às propriedades ácido-base do agente de revestimento e dependendo a solubilidade do seu ponto isoelétrico^[8].

Uma das funcionalizações mais comuns em AuNPs é a adição de moléculas de cadeia alifática, com um grupo tiol numa extremidade e um grupo carregado na extremidade oposta. O grupo tiol possui grande afinidade para metais nobres como o ouro, adsorvendo à superfície da nanopartícula. A cadeia alifática, devido à sua forma, permite um bom empacotamento destas moléculas ao redor das AuNPs, conferindo assim grande estabilidade, algo que é ainda mais facilitado pelos grupos carregados no final da cadeia alifática, que repelem outras AuNPs e impedem assim a agregação^[8]. Um exemplo de uma molécula deste tipo bastante comum na funcionalização de AuNP é o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), em que o grupo terminal é um grupo carboxilo.

Outro tipo de funcionalização para AuNPs consiste na utilização de polipéptidos, visto serem as proteínas hidrossolúveis um tipo de nanopartículas naturais em organismos vivos que, em condições fisiológicas, não agregam^[30]. Tomando partido da capacidade das proteínas em adequarem a sua estrutura tridimensional em função do meio onde se encontram, num meio aquoso os grupos hidrofóbicos ficam localizados para o interior da molécula, expondo os grupos hidrofílicos para o solvente, e evitando atrações eletroestáticas entre grupos terminais C e N das proteínas do polipéptido, é possível adicionar às AuNPs um revestimento de polipéptido com um grupo tiol^[30]. O polipéptido usado com sucesso, conferindo estabilidade e solubilidade em água às AuNPs, é o CALNN (Cisteína, Alanina, Leucina, Asparagina, Asparagina). Este polipéptido possui um grupo tiol na cadeia lateral do aminoácido cisteína, permitindo a formação de uma ligação covalente com o ouro e forma-se uma monocamada densa à superfície da AuNP. A asparagina na posição final do polipéptido, devido ao seu grupo carboxilo, confere carga negativa à superfície da nanopartícula^[30].

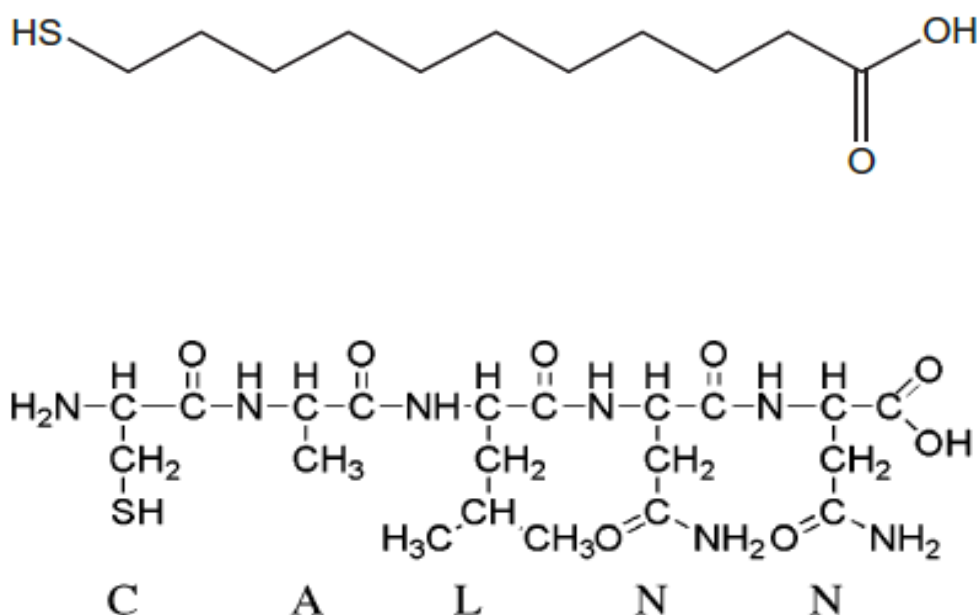


Figura 1.4 – Estrutura de possíveis agentes de revestimento de AuNPs. Em cima: estrutura da molécula MUA ^[8]; em baixo: estrutura do péptido CALNN ^[30].

Além de protegerem as AuNPs contra agregação conferindo estabilidade numa larga gama de força iónica e pH, algo bastante útil para aplicação em sistemas biológicos, estes ligandos funcionam também como moléculas de reconhecimento, abrindo caminho para várias aplicações na área da bionanotecnologia e biologia ^[30], por exemplo como suporte para imobilização de biomoléculas, mantendo a sua atividade ou até potenciando-a ^[31,32].

1.2.2 AuNPs como suporte de imobilização para biomoléculas

Devido às suas dimensões, uma das aplicações mais comuns das AuNPs é a imobilização de biomoléculas como proteínas ou enzimas, ou mesmo DNA na superfície das AuNPs, de forma a cobrir as mesmas. As semelhantes dimensões das AuNPs e biomoléculas tornam-nas estruturalmente compatíveis ^[33]. A conjugação entre estes dois tipos de materiais é denominada de bionanoconjugados (BNCs). Esta pode ocorrer por ligação covalente, em que o grupo tiol de uma proteína liga à AuNP; adsorção, devido a interações eletroestáticas entre cargas opostas dos dois materiais ou através de uma interação específica entre AuNP e a biomolécula, como por exemplo a ligação entre um antígeno e uma AuNP conjugada com o respetivo anticorpo ^[33].

O método mais comum para conjugação de biomoléculas com AuNPs funcionalizadas é a adsorção eletrostática devido à sua simplicidade e não necessitar de reação química acoplada, tendo sido usado com sucesso em várias aplicações ^[8,34]. No entanto, este método está restringido apenas a moléculas carregadas e a estabilidade dos conjugados pode ser facilmente afetada por propriedades do meio como pH, força iônica e presença de outras moléculas carregadas ^[8]. Uma alternativa à adsorção, para a imobilização de biomoléculas é a formação de ligações covalentes, por exemplo entre grupos amina presentes na proteína e a superfície metálica da AuNP funcionalizada com grupos carboxilato, recorrendo a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC/NHS) ^[8]. Apesar de conferir estabilidade à proteína, a ligação covalente leva a alterações conformacionais que a inativam parcialmente ^[35], devido à alteração da estrutura tridimensional que implica perda de atividade ^[35] e função.

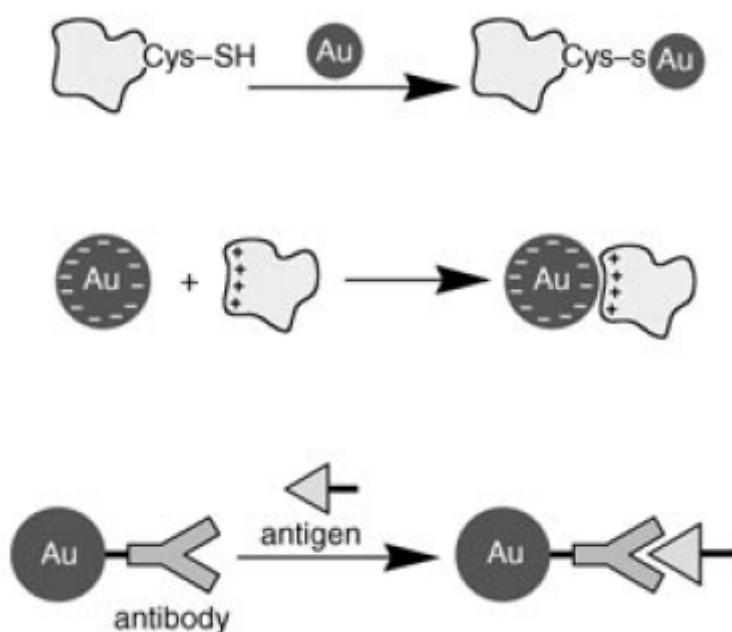


Figura 1.5 - Estratégias de formação de bionanoconjugados. De cima para baixo: ligação covalente a AuNP; adsorção eletrostática a AuNP; ligação específica de antígeno a AuNP funcionalizada com respectivo anticorpo ^[33].

Devido às dimensões nanométricas das biomoléculas como enzimas, o uso de materiais nanométricos com uma alta razão de área para volume, como suportes de imobilização para biomoléculas poderá beneficiar as mesmas ^[36]. Deste modo, o uso de nanomateriais, como AuNPs, pode maximizar a quantidade de enzima efetivamente recobrindo a sua superfície, devido à sua grande área de superfície ^[37,38]. O recobrimento da superfície da AuNP leva à formação de uma coroa proteica

^[39] e, ao contrário de materiais sólido de maior escala, estes BNC apresentam movimento *Browniano* em solução, apesar da mobilidade ser, em teoria, menor que a observada em enzimas na sua forma livre em solução ^[37]. A forma esférica das AuNPs diminui também a interação entre proteínas adsorvidas à superfície e ajuda a manter a estrutura das mesmas pois ocorrem menos alterações conformacionais ^[40]. Outro dos benefícios da conjugação das AuNPs é a maior estabilidade coloidal ^[38] dos BNCs conferidos pela presença de proteínas. Durante o processo de conjugação é necessário cuidado especial, de modo a prevenir desnaturação e sobressaturação da superfície das AuNPs com proteína, evitando a formação de multicamadas proteicas que levaria a limitações de difusão do substrato para as camadas interiores ou até levar à desnaturação enzimática ^[38].

Alguns exemplos de enzimas já imobilizadas em AuNP são a pepsina, lipase, tripsina, BSA, lisozima, glucose oxidase, aminopeptidase e álcool desidrogenase ^[31,32,35,41,42].

A imobilização enzimática é de particular interesse para a biotecnologia pois permite maior estabilidade e durabilidade da enzima, além de permitir a reutilização da mesma e separação mais fácil dos produtos de reação, podendo representar um potencial método para redução de custos ^[35,43]. A imobilização enzimática em AuNPs apresenta como desafio a tentativa de otimizar as condições de conjugação que permitam alcançar maior seletividade e estabilidade, baixos limites de detecção e que mantenham ou aumentam a atividade catalítica ^[44].

1.2.3 Aplicações para Bionanoconjugados

No caso de enzimas redox, a imobilização em AuNPs é facilitada pela interação entre os dois materiais que, pensa-se, ajuda a proteína a assumir uma orientação favorável ou a tornar possível a formação de canais entre os grupos prostéticos e a superfície metálica ^[35]. As AuNPs funcionam também, neste caso, como centros condutores de elétrons ^[35] que as tornam num bom material para uso em biossensores. Alguns dos casos de enzimas redox imobilizadas em nanopartículas vão desde glucose oxidase, álcool desidrogenase, xantina oxidase e peroxidase ^[45,46]. Estes bionanoconjugados permitem a construção de biossensores bastante estáveis, retendo a atividade da enzima e permitindo o aumento da transferência direta de elétrons entre a superfície do eléctrodo e a enzima redox, levando a que o processo seja mais rápido e eficiente ^[44]. Uma alternativa ao biossensor de glucose, o mais comercializado em todo o mundo ^[47], permite a detecção e quantificação dos níveis de glucose no sangue, recorrendo a um eléctrodo coberto com glucose oxidase ligada covalentemente a AuNPs ^[45], que quantificará a oxidação da glucose.

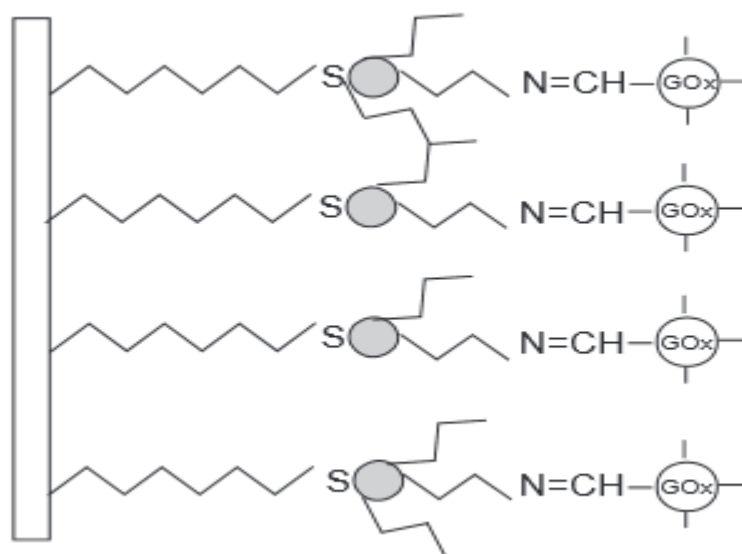


Figura 1.6 – Esquema de um eletrodo coberto com AuNPs ligadas covalentemente a glucose oxidase (GOx) para a detecção de glucose ^[45]

Pesticidas, compostos fenólicos e derivados são contaminantes com grande importância na área do controle alimentar e ambiental, bem como na área da saúde devido à serem carcinogênicos e altamente tóxicos, até em baixas concentrações ^[48-50]. Como tal, existe a necessidade de procedimentos analíticos que permitam a detecção e monitorização destes compostos com alta sensibilidade, ou seja, a baixas concentrações ^[49]. Como tal, eletrodos enzimáticos ou biossensores que permitam a detecção de fenóis apresentam-se como uma possível ferramenta para este fim. A conjugação de AuNPs com enzimas permite facilitar a transferência de elétrons entre o centro catalítico da enzima imobilizada com o eletrodo e deste modo aumentar a sensibilidade e seletividade do biossensor ^[48], bem como a rapidez do rastreio de fenóis ^[50]. A tirosinase apresenta-se, neste caso, como uma enzima de grande interesse pois catalisa a oxidação de fenóis às respectivas *o*-quinonas na presença de oxigénio. A detecção ocorre pela monitorização do consumo de oxigénio ou pela formação da *o*-quinona ^[49]. Este tipo de eletrodos mostrou manter a atividade da enzima bem como uma resposta rápida e alta sensibilidade a fenol, cerca de 4,25 vezes superior, na presença de AuNPs ^[49].

A imobilização de DNA e anticorpos é também uma das grandes e mais interessantes aplicações das AuNPs. Estes bionanoconjugados são utilizados para diagnóstico, sendo facilmente funcionalizáveis e permitindo, deste modo, ajustar as propriedades dos mesmos conforme o pretendido ^[8]. Para este tipo de biodiagnóstico, o método mais desenvolvido baseia-se na detecção colorimétrica dependendo na distância entre AuNPs, sendo mais utilizado para detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos. Neste método, observa-se a mudança de cor, de vermelho para azul, das AuNPs ao mudarem do seu estado de dispersão coloidal para agregado. A sonda de AuNPs, contendo a

sequência complementar à da sequência alvo, no caso de ocorrer hibridação manterá a cor vermelha. Caso contrário, após a adição de solução de agregação, por não ocorrer hibridação levará à agregação das AuNPs e consequente mudança de cor para azul. Este método, apesar de mais utilizado para reconhecimento de sequências específicas de ácidos nucleicos, pode também servir para a detecção de proteínas, anticorpos/antígenos e açúcares ^[8]. Outros métodos baseiam-se em sondas altamente seletivas de AuNPs funcionalizadas usadas em ensaios de *quenching* de fluorescência: cromóforos a distâncias menores que 5 nm sofrem *quenching* e a distâncias superiores a 10 nm, um aumento de intensidade da sua fluorescência, e por fim métodos eletroquímicos, onde o sinal é potenciado pelas AuNPs ^[8].

Imunoensaios podem também ser realizados com bionanoconjugados. Normalmente, para tal são incubados os anticorpos de interesse com AuNPs com revestimento de citrato. A detecção, nestes ensaios, baseia-se em métodos eletroquímicos, podendo ser imobilizados na superfície de elétrodos, os bionanoconjugados de imunoglobulinas (por exemplo IgG). Devido à sensibilidade das AuNPs como transdutores de sinal, estas podem também ser usadas em imunoensaios em tempo real, monitorizando para tal, desvios no comprimento de onda da plasmónica de absorção característica das mesmas ^[8]. Ensaios ELISA foram também recentemente melhorados recorrendo a AuNPs, como no caso da detecção do antígeno CA15-3, um biomarcador de cancro da mama, importante para o seguimento do tratamento da doença. O uso de AuNPs melhora o sinal ótico, aumenta a sensibilidade e diminui o tempo dos ensaios ^[8,51].

As AuNPs são utilizadas também para o transporte e entrega de fármacos, como péptidos, proteínas, DNA plasmídico, RNA de interferência (siRNA) e agentes quimioterapêuticos ^[52]. A metodologia mais utilizada no fabrico destas AuNPs envolve a modificação da sua superfície com polímeros catiónicos ou grupos reactivos, como tiol, amina ou carboxilo ^[52]. A superfície funcionalizada das AuNPs permite a imobilização eficaz e estável dos vários fármacos ^[52]. As AuNPs apresentam também a vantagem de serem inertes, não tóxicas e biocompatíveis. ^[53] A imobilização permite evitar degradação enzimática, dos fármacos, melhorando a eficácia dos mesmos ^[52]. Estes conjugados tornam-se mais eficazes quando conseguem transpor barreiras biológicas no organismo, algo que pode ser conseguido modificando o *design* das AuNPs ^[54] Estas são capazes de transportar uma grande concentração de fármacos, devido à sua elevada área superficial, sendo por este motivo transportadores eficientes ^[55]. Os conjugados reduzem também a distribuição para órgãos que não os afetados ^[55], melhorando a eficácia da terapia.

Ultimamente tem sido também explorada a forma como as nanopartículas, de ouro ou de prata, intensificam o sinal em espectroscopia de Raman ^[8,56]. Biomoléculas que apresentavam sinal fraco ou inexistente, quando conjugadas com estas nanopartículas, passam a apresentar uma melhoria significativa de sinal. Este tipo de espectroscopia, SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) poderá ser uma importante ferramenta de análise no futuro, pois além de ser complementar à

espectroscopia de infravermelho, permite obter importante informação estrutural e podendo possivelmente até ser utilizada como ferramenta de diagnóstico, por exemplo em imunoenaios ^[8].

Todas estas diferentes aplicações e propriedades das AuNPs exemplificam as inúmeras possibilidades que a bionanotecnologia abre e como este campo pode ser importante para o futuro da investigação, nomeadamente no diagnóstico e tratamento de doenças, na biorremediação e em indústrias como a farmacêutica e alimentar.

1.3 Tirosinase

A tirosinase (EC 1.14.18.1; monofenol, 3,4-dihidroxi L-fenilalanina (L-DOPA): oxigénio oxidoreductase) é uma enzima contendo cobre, pertencendo à classe de oxidoreductases. É uma enzima bastante versátil e ubíqua, presente em vários organismos desde bactérias, fungos, plantas a mamíferos e insetos ^[57], sendo também muitas vezes referida como polifenol oxidase ^[58].

Esta enzima catalisa duas diferentes reacções: a primeira consiste na hidroxilação de um monofenol, como a tirosina, para orto-difenol, como L-DOPA (atividade de monofenolase ou cresolase). A segunda reacção que a enzima catalisa consiste na oxidação do orto-difenol para a sua correspondente orto-quinona derivada (atividade de difenolase ou catecol oxidase), que é consequentemente convertida em melanina ^[59], por reacções de autopolimerização não enzimática ^[57].

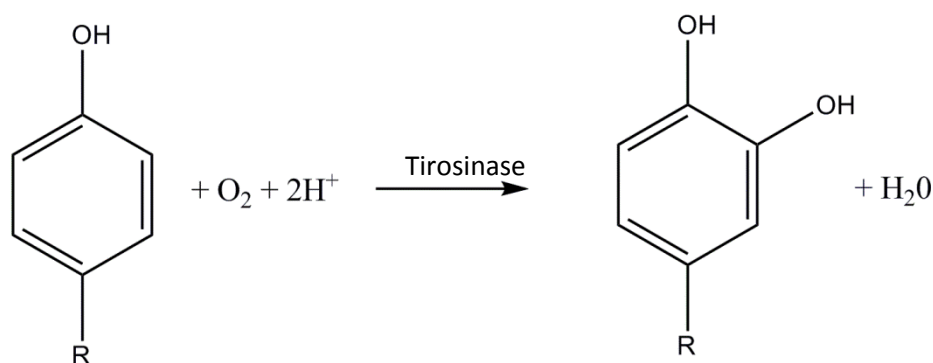


Figura 1.7 - Reação de monofenolase catalisada por Tirosinase (desenho efetuado recorrendo ao software ChemDraw ^[60])

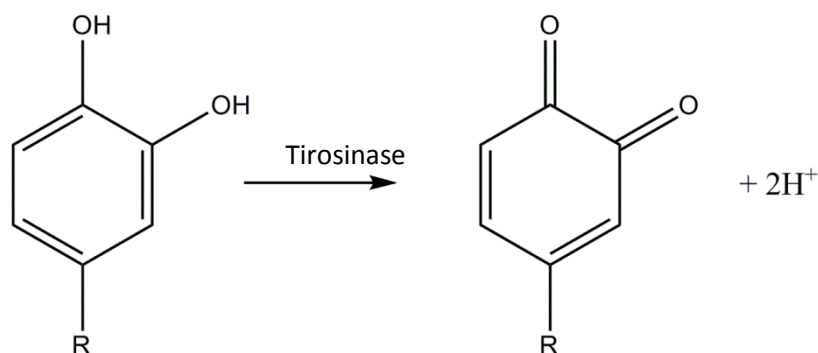


Figura 1.8 - Reação de difenolase, catalisada por Tirosinase (desenho efetuado recorrendo ao software ChemDraw ^[60])

Os principais substratos da tirosinase são a tirosina e L-DOPA, apesar de poderem também ser utilizados como substrato um grande número de monofenóis, difenóis e polifenóis estruturalmente diferentes ^[61,62]. Uma outra classe de compostos oxidados pela tirosinase são os catecóis, que são produzidos em escala industrial como precursores de pesticidas, perfumes e compostos farmacêuticos ^[63]. O esqueleto da molécula de catecol está presente também em produtos naturais, como antioxidantes. Além de serem formados como produto da reação de oxidação de fenóis e ácido benzóico, a transformação ambiental de fenóis e clorofenóis resulta também na produção de catecol ^[64]. A característica mais conhecida destes compostos é a facilidade com que são oxidados ^[63]. Como tal, estes compostos são muitas vezes utilizados como substratos em estudos cinéticos com tirosinase, em particular 4-metilcatecol (4MC). A oxidação deste composto tem também atraído interesse devido a pensar-se que a síntese de topaquinona, cofactor de amina oxidases de cobre, procede por um intermediário de catecol, e também porque a oxidação catecolamina dopamina, um neurotransmissor cujo precursor é um difenol, poderá ser um factor que contribui para a morte de neurónios dopaminérgicos, originando a doença de *Parkinson* ^[65].

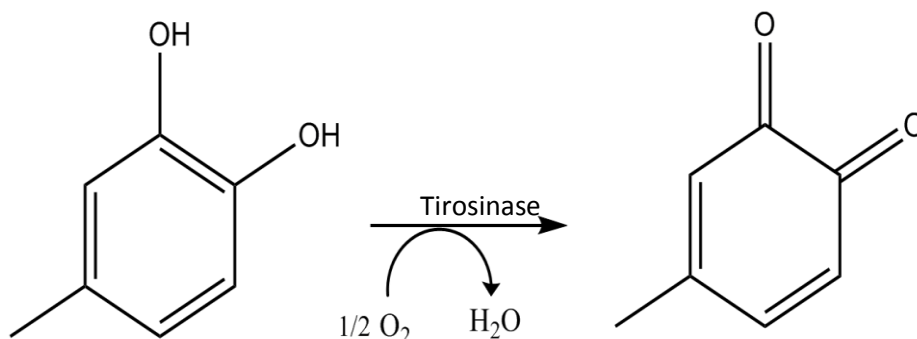


Figura 1.9 - Reação de oxidação de 4MC, catalisada por Tirosinase (desenho efetuado recorrendo ao software ChemDraw ^[60])

Tanto em plantas como em organismos inferiores, a tirosinase é a única enzima responsável pelo controlo da síntese de melanina, sendo que a via de síntese procede a partir de L-DOPAquinona^[66]. Em animais tal não se verifica devido à duplicação do gene *Tyr*, que produziu dois outros genes que codificam proteínas semelhantes - Tyrps (*Tyr related proteins*) – ainda que com diferentes funções e capacidades catalíticas, que após a formação dos intermediários de quinonas, permitem a formação de um polímero de melanina mais ordenado e estruturalmente diverso^[66]. A tirosinase humana difere também de outras tirosinases, por ser uma glicoproteína ligada a membrana. Mutações na enzima humana estão relacionadas com albinismo^[66].

Pensa-se não existir uma tirosinase comum, pois enzimas de animais, plantas e fungos apresentam diferenças relativamente à sequência, tamanho, ativação e glicosilação^[67]. Em plantas, as tirosinases não apresentam actividade de monofenolase, sendo denominadas de catecol oxidases^[66]. Nas plantas desempenha um importante papel no seu metabolismo, incluindo no sistema respiratório, na manutenção do potencial de oxidação-redução, efeito antibiótico e no sistema de reposta a feridas^[61]. Neste último, *o*-quinonas formadas após o dano ao tecido são oxidadas, protegendo a ferida de agentes patogéneos e insetos^[68]. Em insetos e artrópodes, as quinonas altamente reativas, resultantes da ação da tirosinase, fazem parte do processo de esclerotização da matriz proteica da cutícula^[67]. A tirosinase é portanto uma proteína bastante importante nas áreas da medicina, agricultura, indústria alimentar e cosmética^[69]. Está envolvida em processos de escurecimento (*browning*) enzimático não só na fruta mas também na pele e no cabelo^[70]. A reação de escurecimento é importante na indústria alimentar e na agricultura devido ao efeito que tem na qualidade da fruta e vegetais pela oxidação dos seus polifenóis^[68]. A tirosinase atrai também bastante interesse devido ao seu uso na síntese ou modificação de compostos como o coumestrol, que mimetiza a acção biológica do estrogénio, e L-DOPA que é usado no tratamento da doença de *Parkinson*^[61].

1.3.1 Tirosinase de *Agaricus bisporus*

As tirosinases melhor caracterizadas são as isoladas de fungos como *Neurospora crassa* e *Agaricus bisporus*^[71,72], sendo que esta última será a enzima em estudo nesta dissertação. Atualmente apenas existem preparações comerciais de tirosinase isolada de *Agaricus bisporus*, sendo que esta é bastante homóloga à tirosinase de mamíferos e tem sido utilizada como modelo para estudos de melanogénese^[71,72].

A tirosinase de *Agaricus bisporus* encontra-se presente no citosol ^[73] e é responsável pelo escurecimento enzimático, algo que é indesejado nos cogumelos pois é responsável pelo aspeto menos desejável dos mesmos e perda de qualidade nutricional ^[74].

Esta enzima, como referido no tópico anterior para as tirosinases em geral, catalisa duas reações distintas: a conversão de monofenol a difenol (atividade de monofenolase) e a conversão de difenol a *o*-quinona respectiva (actividade de difenolase), na da presença de oxigénio molecular. A reação de difenolase ocorre mais rapidamente, $k_{\text{difenolase}} = 10^7 \text{ s}^{-1}$ comparativamente com a segunda reação, $k_{\text{monofenolase}} = 10^3 \text{ s}^{-1}$, que é considerada como sendo o passo limitante da reacção geral ^[62], sendo que ambas apresentam especificidade a um grande número de substratos. A tirosinase tem, no entanto, maior afinidade para os isómeros L de um composto que para os isómeros D do mesmo ^[72].

Os seus principais substratos são a tirosina, γ -L-glutaminil-4-hidroxibenzeno (GHB) e os seus produtos de oxidação L-DOPA e γ -L-glutaminil-3,4-dihidroxibenzeno (GDHB), respetivamente ^[74]. Além destes, 4MC é outro substrato da tirosinase ,com bastante relevância em muitos vegetais, juntamente com ácido clorogénico, catecol, catequina, ácido cafeico, ácido 4-hidroxifenilpirúvico, ácido *p*-cumárico e *p*-cresol ^[75]. A tirosinase atua diretamente em 4MC, que por a ser um difenol, faz com que esta reação não seja dependente da reação de monofenolase e como tal, a não depende da velocidade da primeira reação ^[75].

1.3.2 Caracterização da Tirosinase de *Agaricus bisporus*

A tirosinase de *Agaricus bisporus* tem peso molecular de aproximadamente 120 kDa. Ocorre na forma de tetrâmero H_2L_2 , composto por duas subunidades iguais de 43 kDa (H) e por duas outras subunidades iguais de 14 kDa (L). A subunidade H na forma de monómero apresenta atividade pensando-se ser responsável pela atividade da tirosinase, sendo que ainda é desconhecida a origem e função da subunidade L ^[59]. O ponto isoelétrico (pI) da enzima encontra-se entre 4,7 e 5 e esta tem um pH óptimo de actividade entre 6 e 7 ^[58].

A tirosinase de *Agaricus bisporus* possui uma característica intrigante e pouco usual ao poder existir num estado inativo ou latente. As formas latente e ativa podem ser encontradas simultaneamente ou em apenas numa das formas, sendo que forma latente representa cerca de 98/99% da totalidade da atividade total ^[76]. A enzima na forma latente pode ser activada por diversos compostos como detergentes, proteases, catiões divalentes, ácidos gordos, poliaminas, ureia e álcoois

^[76]. A ativação da enzima pode também ocorrer como reacção a ataque por parte de patogéneos. A ativação por SDS ocorre devido à ligação de pequenas quantidades do mesmo à enzima latente, provocando alterações conformacionais, sendo que este processo é reversível, podendo a tirosinase voltar à forma latente ^[76]. Este processo de ativação é interessante pois poucas enzimas são activadas por SDS, sendo a maior parte inativadas pelo mesmo composto ^[76].

A recente sequenciação do genoma de *Agaricus bisporus* aliada ao estudo de cristalografia de raios-X da tirosinase permitiu elucidar a estrutura da mesma ^[59]. A estrutura tetramérica obtida por cristalografia de raios-X é estabilizada por dois iões de hólmio, coordenados pelos resíduos Asp336, Asp353 e Gln351 de uma subunidade H e pelo resíduo Asp312 da outra subunidade H. Pensa-se que estes iões diminuam a repulsão electrostática na interface do dímero. O cálcio, sendo análogo a este ião, estimula também a associação em tetrâmeros das tirosinases de *Agaricus bisporus*. A interface entre as duas subunidades H e L é estabilizada por duas pontes de sal entre His76 (H) e Glu139 (L) e entre Glu317 (H) e His56 (L). Esta interface é ainda estabilizada por ligações de ponte de hidrogénio entre vários resíduos e também por interações polares e hidrofóbicas. A subunidade H é composta pelos resíduos 2-392, contendo 12 hélices α , 8 folhas β e vários *loops*. É estruturalmente semelhante a domínios tirosinases de outros organismos, apesar de possuir entre 100 a 120 resíduos mais. A região central da tirosinase, incluindo o seu centro catalítico, está compreendida na subunidade H. Começa no resíduo Arg20 e termina em Tyr365. A sequência de resíduos 18- 20 encontra-se paralela aos resíduos 363-365, contribui para a estabilização das regiões terminais N e C da região central da enzima, assim como para a estabilização dos motivos de ligação Cu-A e Cu-B. A subunidade L é composta pelos resíduos 9-28 e 35-150, consistindo em 12 folhas β anti paralelas. Ao contrário de H, a subunidade L não apresenta semelhanças relativamente a tirosinases de outros organismos e não exerce grande efeito na atividade da enzima. São, no entanto, ainda necessários mais estudos de forma a elucidar o papel biológico desta subunidade e o seu efeito no funcionamento da subunidade H ^[59].

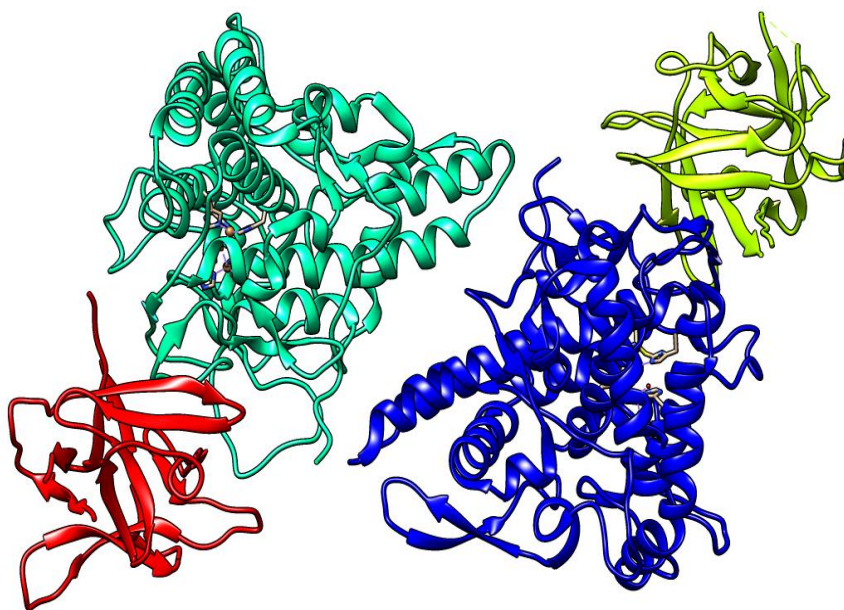


Figura 1.10 - Modelo tridimensional da estrutura da enzima tirosinase (código PDB : 2Y9W ^[59]). As subunidades H encontram-se coloridas de azul claro e escuro. As subunidades L encontram-se coloridas a vermelho e amarelo. Imagem produzida recorrendo ao *software* Chimera ^[77].

1.3.3 Centro ativo da tirosinase de *Agaricus bisporus*

A atividade catalítica da tirosinase está associada com o seu centro activo contendo dois átomos de cobre. Um conjunto de 4 hélices α , $\alpha 3$ e $\alpha 4$, $\alpha 10$ e $\alpha 11$, formam o centro catalítico, compreendido na região central da subunidade H, entre os dois pares antiparalelos de hélices. Cada íon de cobre é coordenado por três resíduos de histidina: His61, His85 e His94 ($\alpha 3$ e $\alpha 4$) coordenam o primeiro íon de cobre Cu-A e Cu-B é coordenado por His259, His263 e His296 ($\alpha 10$ e $\alpha 11$). Estas histidinas são pouco flexíveis, tendo rotação limitada devido a interações com outros resíduos e moléculas de água internas. A presença de resíduos Phe90 e Phe292, que fazem parte de motivos Phe-His altamente conservados em tirosinases, contribuem para a baixa flexibilidade destes locais. Esta limitação mantém a integridade dos locais de ligação de cobre ^[59].

Ambos os locais de ligação de cobre adoptam uma geometria trigonal planar, com uma molécula de água a estabelecer ligação por pontes de hidrogénio com ambos os íões de cobre. Esta cavidade está acessível ao solvente, permitindo a ligação do substrato ou inibidor sem que ocorram alterações conformacionais. O mecanismo de reacção da tirosinase é pouco claro, tendo sido colocada como hipótese que o substrato seja orientado por interações hidrofóbicas com His263 de Cu-B. De

seguida o grupo hidroxil do substrato é desprotonado pelo ião peróxido entre Cu-A e Cu-B e o carbono da posição *orto* aproxima-se deste mesmo ião peróxido, sendo onde é *orto*-hidroxilado. Por fim o composto difenólico é oxidado originando a *orto*-quinona respetiva ^[59].

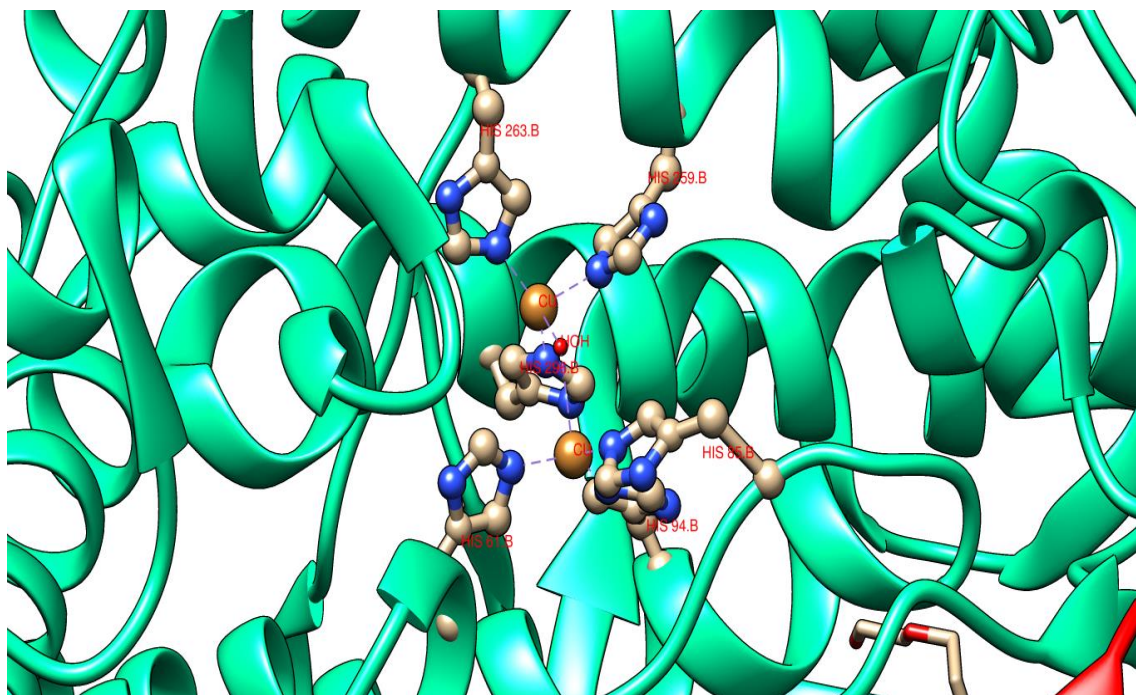


Figura 1.11 - Representação do centro ativo da tirosinase na subunidade H. (código PDB: 2Y9W ^[59]). Imagem produzida recorrendo ao *software* Chimera ^[77]. Observam-se a laranja os átomos de cobre, cada um coordenado por três Histidinas, e uma molécula de água formando pontes de hidrogénio entre os dois átomos de cobre.

O centro ativo da tirosinase pode também encontrar-se num de três estados de oxidação: *met*-tirosinase, *oxi*-tirosinase (forma oxidada) e *desoxi*-tirosinase (forma reduzida) ^[69]. A forma *met* é característica da enzima nativa, incapaz de ligar oxigénio. A forma *desoxi* resulta da redução da forma *met*, originando a sua forma ativa, em que o estado de oxidação do cobre é reduzido de Cu (II) para Cu (I). A ligação de uma molécula de oxigénio a esta resulta na forma *oxi* ^[78].

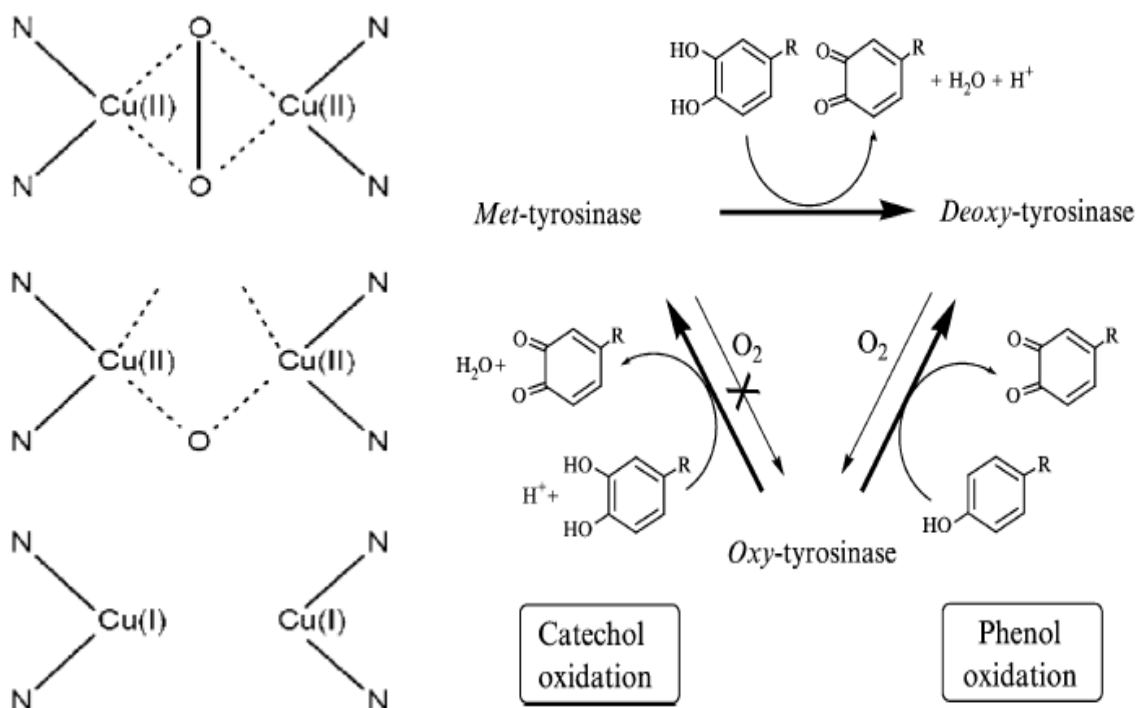


Figura 1.12 – À esquerda: as diferentes formas da tirosinase (de cima para baixo): forma *oxi*, forma *met* e forma *desoxi* ^[69]; à direita: oxidação de fenóis e catecóis por *oxi*-tirosinase ^[78].

A figura 1.12 esquematiza as transformações que ocorrem para a formação da *o*-quinona. *Oxi*-tirosinase oxida fenóis originando a forma *desoxi* que pode ligar mais dioxigénio e continuar o ciclo de oxidação. A oxidação de catecóis origina *met*-tirosinase que por sua vez não consegue ligar dioxigénio. Esta forma tem de ser reduzida por uma segunda molécula de catecol, de modo a formar *desoxi*-tirosinase e consequente regeneração de *oxi*-tirosinase ^[78].

A atividade de monofenolase é caracterizada por um período de latência, que equivale ao tempo necessário para que a forma *met*, incapaz de reagir com o substrato monofenólico, seja ativada para a forma *desoxi* pelo difenol (catecol) correspondente, pela ação de uma pequena quantidade de *oxi*-tirosinase que normalmente acompanha a forma *met*. Este período de latência pode ser diminuído caso seja adicionado um difenol ou um agente redutor capaz de reduzir a forma *met*, à mistura recional de tirosinase com monofenol ^[79].

Em reacções com difenóis, a tirosinase pode ser inativada por um processo denominado por inativação suicida, que ocorre após formação da *o*-quinona. Esta ataca um grupo nucleófilo crucial da enzima ou devido a um radical livre que ataca o centro ativo ^[80,81]. Um outro estudo ^[81] sugere que a tirosinase poderá oxidar difenóis pela reação de monofenolase, sendo o substrato orientado no centro ativo como um monofenol. O produto formado sofre desprotonação resultando na inativação irreversível da enzima devido à redução para Cu (0) no centro ativo, que não é coordenado por

histidinas, levando à perda de 50 % de cobre durante o processo de inativação ^[81]. Este mecanismo envolve inserção de oxigénio no anel aromático, restringindo a inativação à forma *oxi*. No entanto, durante a oxidação de difenóis, esta forma é regenerada a partir de *met* e como tal eventualmente todas as formas podem ser inativadas ^[80,81].

1.3.4 Estudos cinéticos com tirosinase de *Agaricus bisporus*

Neste tipo de estudos são determinados parâmetros como K_m (constante de *Michaelis*) e V_{max} (velocidade máxima de reacção) e K_i (constante de inibição), k_{cat} e k_{cat}/K_m (eficiência catalítica).

Ensaio com tirosinase apresentam algumas dificuldades devido às duas diferentes reacções que catalisam. A determinação da sua atividade é também dificultada pela alta reatividade dos produtos, *o*-quinonas, que são propensas a seguir reacções secundárias resultando na não linearidade observada na absorvância ^[82]. A produção de *o*-quinonas pode também resultar na inativação da enzima.

Para a realização de estudos cinéticos, diferentes técnicas poderão ser utilizadas como manométricas, cronométricas, radiométricas, oximétricas, eletroquímicas ^[83-85]. No entanto, a técnica mais recorrente é a espectrofotométrica, devido à sua maior conveniência, sensibilidade, baixo custo e a possibilidade de seguir a reacção de forma contínua ^[83]. A reacção enzimática pode ser seguida monitorizando a absorvância ao comprimento de onda de formação do produto reaccional ^[86] ou da absorvância no comprimento de onda do consumo do reagente ^[83]. O método *in vitro* mais comum baseia-se no uso de L-DOPA como substrato e monitorizando a formação de dopacromo a 475 nm, sendo como tal um método de determinação indireto pois não é seguida a formação da *o*-quinona ^[86]. A desvantagem do seguimento da reacção pela formação de produtos deve-se à instabilidade dos mesmos que leva a que o ensaio seja linear por um período curto de tempo ^[86]. Uma alternativa a este método baseia-se no uso de MBTH (*3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone hydrochloride*) que reage com a quinona, impedindo-a de reagir novamente. Este método apresenta a desvantagem de ser realizada a pH 4,2 ^[86], um valor abaixo da gama de pH de actividade ótima da enzima. Um outro método popular segue o consumo de oxigénio recorrendo a um eléctrodo. Como os produtos da reacção podem continuar a ser oxidados apenas as taxas iniciais de consumo de oxigénio devem ser determinadas ^[82].

Têm também sido realizados vários estudos do efeito de inibidores de tirosinase, devido ao seu interesse para aplicações em que é necessária a inibição da atividade da enzima. Vários compostos mostraram efeitos inibitórios em tirosinase. Estes compostos podem ser de origem natural como agaritina, ácido *p*-cumárico, quercetina, entre outros, ou de origem sintética como ácido benzóico tropolona, benzaldeído, entre outros ^[87].

1.3.5 Aplicações para tirosinase

A tirosinase apresenta um diverso leque de aplicações. A tirosinase tem recentemente sido utilizada no desenvolvimento de biossensores amperométricos, que permitem uma rápida e simples detecção e quantificação de fenóis que apresentam perigo devido a serem poluentes ambientais ^[87], cuja monitorização deve ser efetuada. Conjugando a ação da tirosinase com as propriedades de nanopartículas metálicas e cobrindo a superfície de elétrodos, poder-se-á conseguir um aumento da sensibilidade e seletividade dos biossensores ^[48]. Nestes casos a superfície das nanopartículas é funcionalizada, com alcanotóis formando uma monocamada automontada (SAM), ou com diferentes agentes de revestimento e até utilizando agentes de reticulação, como EDC/NHS de modo a ligar covalentemente a enzima à superfície das nanopartículas ^[48]. O principal obstáculo na comercialização destes biossensores provém da alta reatividade das quinonas, que ao polimerizarem produzem compostos que podem inativar a enzima e danificar o elétrodo ^[88]. Um outro tipo de biossensor de tirosinase permite a detecção de ácido benzóico em alimentos baseando-se no efeito inibitório que este composto tem na atividade da tirosinase. ^[89]

Devido às reações que catalisa resultarem no escurecimento enzimático de alimentos e produtos alimentares, a tirosinase é uma enzima com particular interesse para a indústria alimentar e na agricultura ^[87]. O mercado mundial para cogumelos comestíveis e trufas está avaliado em cerca de 13 mil milhões de dólares por ano, sendo que metade deste valor é relativo a *Agaricus bisporus* ^[90]. Como o escurecimento ocorre após colheita e ao ocorrer dano nos tecidos do cogumelo, este produto apresenta uma *shelf-life* curta, além de estar associado na mente do consumidor como sendo um produto de baixa qualidade ^[90]. Como tal, esta enzima é alvo de vários estudos com compostos inibitórios da sua atividade, com o intuito de reduzir ou inibir a atividade da mesma em produtos onde este escurecimento seja indesejado ^[87]. A tirosinase pode também levar à hiperpigmentação da pele, em humanos, levando a que inibidores desta enzima são também de interesse para a indústria cosmética, podendo ser usados como branqueadores de pele ou despigmentadores ^[87,91]. No entanto,

em certos produtos como café, cacau, folhas de chá e passas de uva, o escurecimento enzimático é algo desejado para a obtenção do produto final, visto originar propriedades organolépticas distintas no produto final ^[92,93]. As tirosinases fúngicas podem formar ligações covalentes com péptidos, proteínas e hidratos de carbono, podendo ser utilizadas como agente de *crosslinking* na indústria alimentar para texturização de cereais, produtos lacticínios, carne, peixe e derivados ^[92,93], podendo também ser utilizadas no fabrico de pão ^[94].

A biorremediação é outra das áreas de aplicação da tirosinase. A presença de compostos fenólicos em água potável, água para irrigação ou nos solos de cultivo representa um perigo para a saúde e para o ambiente. A remoção destes compostos por enzimas apresentam vantagens em relação a métodos convencionais, químicos ou biológicos, pois não necessitam de período de aclimatização, sofrem menos choques que os microorganismos e não produzem produtos indesejados devido à sua maior especificidade. A capacidade de imobilização da tirosinase apresenta-se também como uma vantagem, além de conferir estabilidade à enzima sem que ocorra perda de atividade, permite a fácil remoção da mesma, assim como redução do custo por não ser necessária a constante adição de enzima. Os produtos da reação de oxidação são também eles insolúveis, sendo facilmente removidos por precipitação ou filtração. Devido a não necessitar de cofactores externos e apenas oxigénio molecular para catalisar reações, a tirosinase permite também uma redução do custo do processo ^[88].

Estudos mostraram também o potencial desta enzima para a sua utilização na produção de biopolímeros biocompatíveis ^[95].

A tirosinase tem também aplicações potenciais na área clínica e na indústria farmacêutica. No tratamento da doença auto-imune *vítigo* que causa hipopigmentação do cabelo e depleção de melanócitos na camada basal da epiderme e em que a tirosina atua como autoantigene e marcador. A tirosinase de *Agaricus bisporus*, administrada oralmente em modelos animais resultou na diminuição da resposta imune ^[87]. A tirosinase poderá também atuar no tratamento de melanoma, através de terapias com recurso a pró-fármacos, com impacto ao nível da via da biossíntese da melanina, utilizando um substrato estruturalmente semelhante à tirosina ^[87].

A tirosinase de *Agaricus bisporus* permite também a síntese de compostos de alto valor acrescentado, tal como o hidroxitirosol, um antioxidante presente no azeite virgem e em azeitonas ^[96], ou como o L-DOPA ^[88,97], o fármaco mais utilizado no tratamento da doença de *Parkinson*. O L-DOPA é um precursor da dopamina e um importante neurotransmissor. A diminuição da concentração de dopamina no cérebro resulta na doença de *Parkinson*. No entanto, a dopamina não pode ser utilizado como fármaco pois é incapaz de passar a barreira entre a corrente sanguínea e o cérebro. Por outro lado, o L-DOPA consegue passar esta barreira ^[97].

1.4 Técnicas

1.4.1 Espectroscopia de Ultravioleta/Visível (UV/Vis)

A espectroscopia de UV/Vis baseia-se na absorção de radiação ultravioleta ou visível. Quando a radiação passa por uma solução ou substância, parte dela pode ser absorvida e a restante transmitida ^[98]. A lei de *Lambert-Beer* que explicita que existe uma linearidade entre a absorvância registada e a concentração, desde que o percurso ótico seja mantido constante:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad (\text{equação 1})$$

Em que A é absorvância, C a concentração, l o percurso ótico e ϵ o coeficiente de extinção molar, constante para cada solução a cada comprimento de onda ^[98].

Uma das aplicações mais importantes desta técnica surge na determinação de parâmetros enzimáticos e velocidade de catálise, observando a velocidade de formação de produto ou do consumo do substrato. Devido às reacções enzimáticas serem normalmente de ordem zero, após uma fase inicial de latência, a relação entre a concentração de substrato, ou produto, e o tempo deve ser linear, até que um destes seja limitante ^[98]. Para tal, pode ser medida a absorvância a um comprimento de onda específico ou obtendo espectros numa gama de comprimentos de onda, ao longo do tempo onde é possível observar o consumo do substrato e formação do produto.

Outra das aplicações desta espectroscopia é em ensaios colorimétricos, por exemplo, na determinação da concentração de proteína. Para tal, os métodos mais comuns são o ensaio de ácido bicinonínico (BCA), ensaio de *Bradford* e ensaio de biureto. Todos estes métodos são colorimétricos e envolvem a formação de um complexo entre Cu (II) e a proteína. Resíduos de cisteína, triptofano, tirosina ou mesmo a própria ligação peptídica, reduzem o cobre para Cu (I) formando um complexo colorido é então quantificado pela medição de absorvância a 562 nm ^[99].

A espectroscopia de UV/Vis permite também a caracterização de AuNPs esféricas em solução aquosa. Através do valor de absorvância a comprimentos de onda específicos, como o máximo de absorção da banda plasmónica e absorvância a 450 nm, é possível não só determinar a concentração da solução de AuNPs mas também determinar o diâmetro aproximado das mesmas ^[100], sem ser necessário recorrer a métodos mais dispendiosos como DLS ou TEM.

1.4.2 Electroforese

A electroforese é uma técnica analítica simples e relativamente rápida, onde moléculas com carga, em solução, são movidas pela aplicação de um campo eléctrico. A velocidade de migração da molécula é dependente da sua carga, tamanho e forma. A electroforese requer uma matriz, geralmente de gel, pois sem a mesma, o calor gerado pela corrente eléctrica levaria à difusão e mistura das bandas separadas. Esta matriz pode ser composta por diferentes materiais, sendo normalmente utilizados géis de agarose ou de poliacrilamida. Neste caso, a matriz actua também de forma a separar as moléculas de acordo com o seu tamanho. No fim da corrida de electroforese, as moléculas separadas são normalmente detetadas na sua posição no gel recorrendo a coloração ^[101].

1.4.2.1 Electroforese em gel de agarose

Devido ao tamanho de poro maior em relação à poliacrilamida, a agarose é normalmente usada para separação de macromoléculas com elevado peso molecular como complexos proteicos ou ácidos nucleicos ^[101].

A electroforese em gel de agarose pode então ser utilizada para caracterizar bionanoconjugados de AuNPs com proteínas. A presença de AuNPs permite que seja visível no gel sem necessidade de coloração, ao exibir a coloração vermelha característica das mesmas. Ao conjugar diferentes concentrações de proteína com AuNPs e realizando uma corrida de electroforese, é possível calcular a mobilidade electroforética dos conjugados e também observar qual a melhor razão molar para cobertura óptima das AuNPs com a proteína de interesse. Como as AuNPs são carregadas negativamente, uma maior cobertura da AuNPs por parte da proteína levará a que ocorra menor migração no gel, não só devido à diferente carga superficial mas também devido ao seu peso molecular maior e diâmetro do BNC comparativamente com AuNPs.

1.4.3 Cinética enzimática

As enzimas são catalisadores de reações e como tal a cinética enzimática é usada para medir e descrever matematicamente a velocidade de reação e calcular as constantes associadas. O modelo molecular usado para descrever a ação de uma enzima é a hipótese de encaixe-induzido (*induced-fit*).

Neste, a enzima liga o seu substrato, formando um complexo enzima-substrato, no qual o substrato é alterado para a conformação de estado de transição e formando o produto reacional. Deste modo, é diminuída a energia de ativação necessária para a conversão em produto e, como tal, aumenta a velocidade de reação devido a um aumento de colisões efetivas que resultam na formação de produto. As enzimas também promovem a catálise ao posicionarem grupos, ácidos ou básicos, chave e iões metálicos na posição certa^[102].

A equação fundamental para a cinética enzimática é a equação de *Michaelis-Menten*:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{equação 2})$$

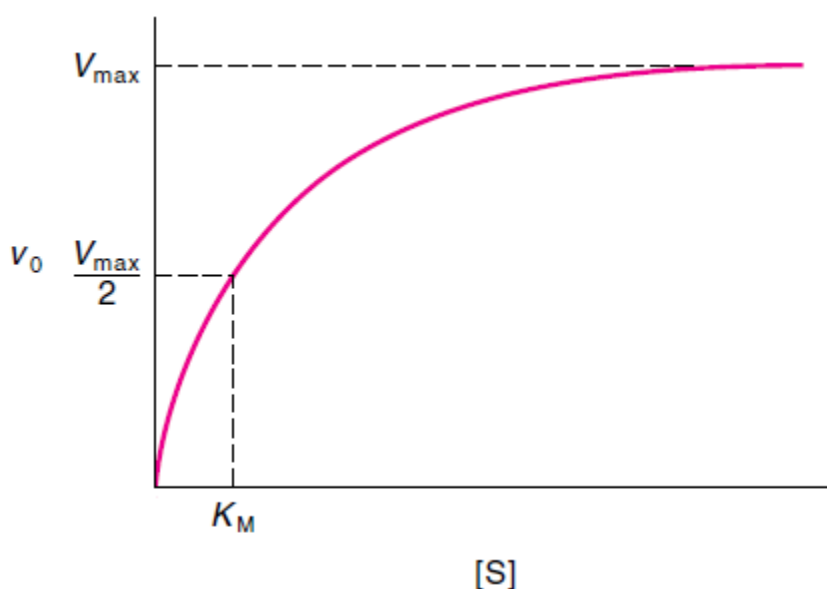


Figura 1.13 – Representação gráfica de uma curva típica de cinética *Michaelis-Menten*, da qual podem ser determinados parâmetros K_m e V_{\max} ^[103].

Num estudo cinético são obtidas velocidades iniciais para diferentes concentrações de substrato, originando uma curva de velocidade inicial em função de concentração de substrato, como pode ser observado na figura 1.13. Na equação 2 v_0 representa a velocidade inicial da reação, com uma concentração conhecida de substrato ($[S]$). K_m representa a constante de *Michaelis-Menten* que por definição é a concentração de substrato correspondente a metade da velocidade máxima da reação (V_{\max}), ou seja, representa a concentração de substrato à qual metade dos centros ativos da enzima se encontram ligados a moléculas de substrato. K_m é também indicativo da força de ligação da enzima ao substrato, em que um valor mais baixo indica maior afinidade e um valor maior de K_m será indicativo

de baixa afinidade. Esta constante depende da temperatura, pH e força iônica, entre outras condições reacionais, pelo que serve para caracterizar um sistema enzima-substrato em condições específicas e uma variação no seu valor é normalmente indicativo da presença de um inibidor ou ativador. O valor de K_m está normalmente compreendido entre 10^{-1} a 10^{-7} M ^[102,103].

Outro dos parâmetros cinéticos que pode ser obtido através da equação é o valor de velocidade máxima da reação, V_{max} . É um valor teórico pois a um certo instante requereria que todas as moléculas de enzima estivessem ligadas ao seu substrato e como tal V_{max} é aproximada a concentrações altas de substrato mas nunca atingida ^[102,103].

Pode também ser calculado o número de *turnover* k_{cat} , sendo este igual a $V_{max}/[enzima]_{total}$. Este corresponde ao número de moléculas de substrato convertidas a produto por moléculas de enzima por unidade de tempo. Quanto maior o valor de k_{cat} mais rapidamente ocorrerão eventos catalíticos. Normalmente este valor encontra-se entre 1 e 10^5 s⁻¹. A razão entre k_{cat} e K_m é definida como a eficiência catalítica e é demonstrativo da especificidade de uma enzima para um certo substrato, pois uma razão alta favorece a formação de produto ^[102,103].

Capítulo II: Procedimentos experimentais

2.1 Instrumentação

As pesagens de reagentes sólidos foram realizadas utilizando uma balança analítica *Radwag As 220/C/2* (0.001 ± 0.0001 g) e uma balança semi-analítica *Sartorius BP610* (0.1 ± 0.01 g).

As medições de pH foram feitas utilizando *Crimson pH Meter Basic 20⁺*.

Ensaio espectrofotométrico em que o controlo de temperatura foi necessário foram realizados utilizando o espectrofotómetro *Unicam Uv/Vis Spectrophotometer Uv2*. Os dados foram recolhidos utilizando o *software* *VisionPro 4.1*, através do método *rate* do mesmo. Com este espectrofotómetro foram também obtidos espectros com o método *Scan* e feita a determinação da proteína com o método *Fixed*.

Diferentes ensaios espectrofotométricos, incluindo ensaios cinéticos, obtenção de espectros de consumo de substrato e formação de produto ao longo do tempo, obtenção de espectros de AuNPs e determinação de proteína, foram realizados utilizando o espectrofotómetro *Varian Cary 50 Bio Uv-Visible* e através do respetivo *software* *Cary WinUv* utilizando as aplicações *Scanning Kinetics*, *Concentration* e *Scan*, respetivamente.

Os processos de centrifugação foram realizados numa centrífuga *Centurion Scientific X3 Series*.

Electroforeses foram realizadas utilizando material *Bio-rad*, no sistema *Mini-Protean* e fonte eléctrica *PowerPac Basic Power Supply*.

2.2 Materiais e reagentes

Tirosinase de *Agaricus bisporus*, sob a forma de pó liofilizado, foi comprado de *Sigma-Aldrich* (T3824, ≤ 1000 unidades/mg sólido). O conteúdo do frasco foi dissolvido em solução de tampão fosfato de potássio pH 7 e feitas alíquotas de 100 μ L que foram prontamente congeladas a -20

°C. Tirosina (Sigma-Aldrich), L-DOPA (98% pureza, Sigma-Aldrich) e 4-metilcatecol (95% pureza, Sigma-Aldrich) foram usados como substratos em ensaios enzimáticos, preparados de fresco antes de cada ensaio, no próprio dia de modo a evitar auto oxidação dos mesmos.

Soluções tampão de fosfato de potássio dibásico (Scharlau), fosfato de potássio monobásico (Riedel-de Haen), glicina (99% pureza, Merck), acetato de sódio (99,5% pureza, Riedel-de Haen), citrato de sódio tribásico desidratado (99% pureza, Sigma-Aldrich), foram preparadas com água mili-Q.

Para a determinação de proteína pelo ensaio de ácido bicinconínico (BCA, *bicionconinic acid assay*), foram utilizadas soluções de ácido bicinconínico (Sigma-Aldrich), sulfato de cobre (II) pentahidratado (4% w/v, Sigma-Aldrich) e solução de albumina de soro bovino (BSA) (1 mg/mL, Sigma-Aldrich).

Relativamente à síntese de nanopartículas de ouro, todo o material de vidro foi previamente colocado numa solução de *Aqua Regia* (mistura 1:3 de soluções de ácido nítrico e ácido clorídrico), durante um dia e de seguida lavado com água mili-Q até não existirem traços do ácido no material. A síntese foi efectuada com solução de ácido tetracloreáurico (III) (30% wt em ácido clorídrico diluído, 99,99% pureza, Sigma-Aldrich), citrato de sódio tribásico desidratado (99 % pureza, Sigma-Aldrich) e água mili-Q.

A funcionalização das nanopartículas de ouro foi efectuada utilizando solução de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) (98% pureza, Sigma-Aldrich), solução de pentapéptido CALNN (adquirido de CASLO Laboratory ApS, Technical University of Denmark).

Para a preparação de géis de agarose para electroforese foi utilizada agarose para biologia molecular da Bio-Rad e tampão TAE pH 8 (Tris-acetato EDTA).

2.3 Procedimentos experimentais

2.3.1 Caracterização da Tirosinase de *Agaricus bisporus*

2.3.1.1 Determinação de unidades específicas de enzima

A atividade específica da tirosinase em relação a diferentes substratos, Tirosina, L-DOPA e 4-metilcatecol foi determinada seguindo os protocolos para ensaios enzimáticos padrão da Sigma (apêndice I).

Para a determinação das unidades de enzima activas referente ao substrato Tirosina, foi medida a absorvância ao comprimento de onda 280 nm, a pH 7 e à temperatura de 25 °C. O cálculo das unidades foi feito segundo a equação 3:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL}} \text{ enzima} = \frac{\left(\left(\frac{\Delta A_{280\text{nm}}}{\text{min}} \right)_{\text{ensaio}} - \left(\frac{\Delta A_{280\text{nm}}}{\text{min}} \right)_{\text{branco}} \right) \cdot (fd)}{(0,001) \cdot (0,1)} \quad (\text{equação 3})$$

Relativamente aos substratos L-DOPA e 4-metilcatecol, as condições dos ensaios são as mesmas exceto a medição da absorvância que é feita a 265 nm. O cálculo das unidades é feito segundo a equação 4:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL}} \text{ enzima} = \frac{\left(\left(\frac{\Delta A_{265\text{nm}}}{\text{min}} \right)_{\text{ensaio}} - \left(\frac{\Delta A_{265\text{nm}}}{\text{min}} \right)_{\text{branco}} \right) \cdot (fd)}{(0,001) \cdot (0,1)} \quad (\text{equação 4})$$

Em ambas as equações, *fd* representa o factor de diluição.

2.3.1.2 Determinação da concentração do preparado enzimático

De modo a evitar perdas da quantidade de tirosinase disponível, dissolveu-se previamente o frasco contendo o pó liofilizado da mesma em 4mL de solução tampão de fosfato de potássio, 10 mM a pH 7. Para determinar a concentração de proteína total no preparado enzimático foi utilizado o ensaio de BCA, um ensaio colorimétrico. Este baseia-se na redução de cobre (II) para cobre (I) por determinados aminoácidos, tais como cisteína, triptofano e tirosina. Com o decorrer da reação, estes

iões reduzidos são quelados pelo ácido bicinconínico ocorrendo a mudança de cor do complexo, de azul para roxo.

Começou – se por preparar uma solução de BCA contendo ácido bicinconínico e sulfato de cobre (II), numa razão de 50:1. De seguida, para a recta de calibração, prepararam-se soluções de concentração crescente de BSA, numa gama de 0 a 35 µg a partir de uma solução *stock* de 1mg/mL, às quais foi de seguida adicionado 1 mL da solução de BCA. De uma forma análoga, retiraram-se 10 e 20 µL da solução de tirosinase e adicionou-se também 1 mL da solução de BCA. Após agitadas, estas soluções foram colocadas a incubar a 37 °C, durante um período de 30 minutos, após o qual permaneceram à temperatura ambiente alguns minutos, antes de se proceder à leitura de absorvância das mesmas. Utilizando água como branco, a leitura das amostras é efectuada ao comprimento de onda de 562 nm e construída a curva de calibração com as soluções de BSA. A partir desta curva, a absorvância das amostras de tirosinase pode ser convertida a concentração.

2.3.3 Determinação do comprimento de onda para ensaios cinéticos

De forma a ser possível seguir a formação de produto da reacção enzimática, obtiveram-se espectros ao longo do tempo, utilizando a aplicação *Scanning Kinetics* no espectrofotómetro *Varian Cary 50 Bio Uv-Visible*, entre os comprimentos de onda de 200 e 800 nm. Os substratos estudados foram 4-metilcatecol, L-DOPA e tirosina. Numa *cuvette* de quartzo foi introduzida a solução de substrato a 5 mM e de seguida adicionado um volume de tirosinase de modo a iniciar a reacção. Imediatamente após a adição da enzima são obtidos espectros até não ocorrer variação do comprimento de onda no máximo de absorção do produto formado.

2.3.2 Determinação da temperatura ótima

Para a determinação da temperatura ótima de funcionamento da tirosinase, foram adicionados, numa *cuvette* de *quartzo* de 3 mL 2,8 mL de tampão fostato 50 mM, pH 7 e 100 µL de solução de tirosinase, incubando de seguida a *cuvette* no espectrofotómetro *Unicam Uv/Vis Spectrophotometer Uv2*, durante 3 minutos de modo a garantir que a solução se encontrava à temperatura desejada. Após a adição de 100 µL de solução de 4-metilcatecol 5 mM seguiu-se a reacção ao comprimento de onda de 400 nm, por um período entre 7 a 10 minutos. Foi estudada uma gama de temperaturas entre 10 e 60 °C e no fim de cada reacção, calculada a velocidade inicial da mesma e construída uma curva da

velocidade inicial em função da temperatura. De modo a poderem ser comparados estes resultados com os valores obtidos para os ensaios da determinação do pH ótimo, estes ensaios foram repetidos utilizando uma solução de mistura de quatro soluções tampão.

2.3.3 Determinação de pH ótimo

Para a determinação do pH ótimo da tirosinase, preparou-se uma mistura de quatro soluções tampão que permitissem operar numa gama vasta de valores de pH pretendidos, entre 2 e 10. Como tal, prepararam-se soluções de fosfato de potássio 200 mM, citrato de sódio 200 mM, acetato de sódio 200 mM e glicina 200 mM, a partir das quais foi preparada uma solução-mãe 50 mM em cada. Prepararam-se de seguida várias soluções tampão, ajustadas ao pH pretendido.

Numa *cuvette* de 3 mL foi adicionado 2,8 mL da mistura de solução tampão e 100 μ L de solução de tirosinase, incubando durante 3 minutos a 25 °C, no espectrofotómetro. Após este período de tempo é iniciada a reacção com a adição de 100 μ L de 4-metilcatecol 5mM. A reacção é seguida no comprimento de onda de 400 nm e após terminada é calculada a velocidade inicial da mesma. Após todos os ensaios é construído uma curva de valores de velocidade inicial em função de valores de pH.

2.3.3 Determinação do coeficiente de extinção molar do produto formado

Para determinar o coeficiente de extinção molar do produto formado na reacção foram efetuadas várias reacções enzimáticas utilizando 4-metilcatecol como substrato e nas condições ótimas de reacção determinadas. Numa *cuvette* de quartzo são introduzidos 1mL de solução tampão fosfato 50 mM pH 6,5 e 50 μ L de tirosinase. A solução é incubada por um período de 3 minutos seguido da adição de 50 μ L de 4-metilcatecol, variando a concentração de substrato em cada ensaio. Foram preparadas seis soluções de substrato de concentrações entre 60 μ M e 6 mM, tendo a concentração final na *cuvette* sido calculada novamente. A reacção é seguida ao comprimento de onda de 400 nm até todo o substrato ser consumido e a curva atingir um *plateau*. Construindo de seguida uma reta com os valores de absorvância quando todo o substrato se encontra consumido em função da concentração de substrato utilizado. Assumindo que todo o substrato é efetivamente consumido, a concentração de produto formado será igual à de substrato inicialmente presente. Através de uma regressão linear, é possível retirar o valor do coeficiente de extinção molar pelo valor do declive da reta, segundo a lei de

Lambert-Beer, $A = c \cdot \epsilon \cdot l$, em que l é o percurso ótico, sendo este igual a 1, A a absorvância, c a concentração e ϵ o coeficiente de extinção molar.

2.3.4 Ensaios cinéticos com Tirosinase

Antes de cada ensaio é preparada no próprio dia uma solução fresca de substrato, garantindo não existir auto oxidação do mesmo. O substrato foi preparado em solução tampão de fosfato potássio 50 mM, pH 6,5.

Os ensaios cinéticos foram realizados nas condições ótimas, determinadas experimentalmente, utilizando como substrato 4-metilcatecol e observando a formação de produto ao comprimento de onda de 400 nm. Numa cuvette de quartzo foram adicionados 2,8 mL de solução tampão de fosfato 50 mM, pH 6,5 e 100 μ L de tirosinase, que foram incubados a 30 °C e 3 minutos no interior do espectrofotómetro. De seguida iniciou-se a reação com a adição do substrato. Este procedimento foi repetido para diferentes concentrações de substrato de modo a obter uma curva do tipo *Michaelis-Menten*. Para tal, no fim de cada reação, foi calculado o valor de velocidade inicial de cada reacção utilizando o declive da tangente aos pontos iniciais da curva e construiu-se um gráfico dos valores de velocidade inicial em função da concentração de substrato utilizado. A partir destes ensaios cinéticos foram também calculados outros parâmetros cinéticos para a tirosinase na sua forma livre em solução. Para a realização do ajuste não linear aos valores experimentais obtidos, de modo a calcular os parâmetros cinéticos e erro associado, foi utilizada a ferramenta *Solver* do *software Microsoft Excel* e a função *Hill* do *software OriginPro 8*.

2.3.5 Síntese de Nanopartículas de Ouro

Todo o material de vidro foi previamente em *Aqua Regia* para eliminar quaisquer vestígios de metais, podendo estes interferir com a síntese e consequentemente lavado com água mili-Q para eliminar vestígios de ácido.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas no laboratório seguindo o método estabelecido por *Turkevich et al.* ^[17,18], com algumas modificações. Resumidamente, adicionaram-se 125 mL de água mili-Q a um balão de fundo redondo e 86,5 μ L de solução de ácido tetracloreáurico (III). O balão foi envolvido em folha de alumínio de modo a evitar o contacto com a luz, colocado um condensador ligado ao mesmo e a solução foi levada à ebulição, sob agitação. Nesta altura são

adicionados 143 mg de citrato de sódio dissolvidos em 12,5 mL de água mili-Q de uma só vez, mantendo a agitação e aquecimento, deixando reagir por 15 minutos. Neste período de tempo, a solução inicial de cor amarela sofre mudanças de cor passando para cinzento/preto até mudar para o vermelho característico da solução coloidal de AuNPs com cerca de 15 nm de diâmetro. Após estes 15 minutos, a solução é retirada do aquecimento mas mantida sobre agitação por mais 15 minutos, ficando de seguida a arrefecer à temperatura ambiente.

2.3.6 Caracterização das Nanopartículas de Ouro

As AuNPs sintetizadas foram colocadas em *erlenmeyers* e tapados com *parafilm*. Cada lote foi seguidamente caracterizado relativamente à concentração e diâmetro das AuNPs, avaliando desta forma a qualidade da síntese. Recorrendo à espectroscopia de UV/Vís. e seguindo a metodologia descrita por *Haiss et al.* ^[100], é possível calcular a concentração de AuNPs em solução, começando por determinar o diâmetro das mesmas através da equação 5 :

$$d = \frac{A_{SPR}}{A_{450\text{ nm}}} \quad (\text{equação 5})$$

Em que d representa o diâmetro das AuNPs, A_{SPR} representa a absorvância medida ao comprimento de onda do máximo de absorção característico das AuNPs e $A_{450\text{ nm}}$ a absorvância medida ao comprimento de onda de 450 nm. Utilizando uma curva de calibração do logaritmo dos valores de diâmetros e coeficientes de extinção molar para cada um destes diâmetros ^[100], é possível saber o valor do coeficiente correspondente ao diâmetro das partículas em solução e relacionar, pela lei de *Lambert-Beer* a concentração com o diâmetro. Para o cálculo da concentração, sendo o percurso ótico igual a 1, é utilizada a seguinte equação:

$$c = \frac{A_{450\text{ nm}}}{\epsilon_{450\text{ nm}}} \quad (\text{equação 6})$$

Em que c representa a concentração, $A_{450\text{ nm}}$ a absorvância medida ao comprimento de onda de 450 nm e $\epsilon_{450\text{ nm}}$ o coeficiente de extinção molar de AuNPs a este comprimento de onda.

2.3.7 Funcionalização das Nanopartículas de Ouro

Para a funcionalização das AuNPs, foram utilizados como ligandos ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e o pentapéptido CALNN (cisteína, alanina, leucina, asparagina, asparagina). Devido à presença de um grupo tiol em cada um destes ligandos, e tirando partido da sua forte afinidade para o ouro, relativamente ao seu revestimento inicial de citrato, a funcionalização das AuNPs ocorre por simples incubação durante a noite a 4 °C, após a adição do ligando à solução de AuNPs.

AuNPs funcionalizadas com MUA (AuNP-MUA) foram preparadas seguindo uma razão de concentração 1:5000 (AuNP : MUA), a partir uma solução de MUA 10 mM em etanol. AuNPs funcionalizadas com CALNN (AuNP-CALNN) foram preparadas seguindo uma razão de concentração 1:1000 (AuNP : CALNN) a partir de uma alíquota de solução de CALNN 5 mM.

2.3.8 Preparação dos bionanoconjugados

Devido à agregação verificada nas AuNPs com o uso de solução de tampão fosfato 50 mM, a concentração da solução foi alterada para 10 mM para todos os estudos com os bionanoconjugados. O pH foi mantido a 6,5 pois não levava a que ocorresse agregação e, deste modo, a enzima continuava no seu pH ótimo. A conjugação entre a tirosinase e AuNP –Cit, AuNP-MUA e AuNP-CALNN é feita por simples incubação durante a noite a 4 °C, após a adição da quantidade de tirosinase pretendida à solução de AuNPs. Pretende-se, desta forma, obter uma solução onde a tirosinase se encontre eletrostaticamente adsorvida na superfície das AuNPs. A concentração de tirosinase a adicionar foi calculada a partir da equação 7:

$$razão\ molar = \frac{[tirosinase]}{[AuNPs]} \quad (\text{equação 7})$$

Em que [tirosinase] representa a concentração de tirosinase em nM e [AuNPs] representa a concentração de AuNPs com a funcionalização desejada. Foram estudadas razões molares de 15 a 300. De uma forma análoga, foram também preparados bionanoconjugados mantendo a concentração de tirosinase constante e variando a concentração de AuNPs.

2.3.9 Estudos cinéticos com bionanoconjugados

Os ensaios cinéticos com os bionanoconjugados foram efetuados de forma análoga aos ensaios realizados com tirosinase livre em solução, com a alteração da variação da concentração da solução tampão de 50 para 10 mM, como indicado em 2.3.8. O volume da *cuvette* foi alterado de 3 mL para 1 mL de volume final. Com as exceções destas alterações, as condições dos ensaios foram as determinadas e seguidas em 2.3.4. Os ensaios cinéticos referentes a este ponto foram realizados todos no mesmo dia de modo a garantir que os resultados seriam comparáveis.

Para a preparação dos BNC no estudo em que a razão molar foi de 350, as AuNPs funcionalizadas com citrato, MUA e CALNN foram concentradas centrifugando as soluções durante 25 minutos a 7000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado volume de solução tampão fosfato pH 6,5 10 mM de modo a que a concentração final das mesmas fosse 16 nM.

Os ensaios para a comparação de velocidades iniciais da reacção entre a tirosinase livre e os BNCs, foi realizada com concentração de substrato 200 μ M, nas condições óptimas de temperatura e pH e monitorizando a absorvância a 400 nm ao longo de 5 minutos.

2.3.10 Electroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados pesando 0,22g de agarose e dissolvendo, sob aquecimento, em 45 mL de solução tampão TAE pH 8, para uma concentração final de 0,5 %. Após ter arrefecido, a solução foi depositada no suporte e introduzido o pente. Uma vez solidificado, o gel está pronto para ser utilizado.

Os bionanoconjugados usados neste estudo foram preparados com incubando AuNPs 6,5 nM com diferentes concentrações de tirosinase durante a noite. As razões molares estudadas foram 30, 55, 200, 400, 800, 1600, 2385, 3180 e 3975 para os três tipos de AuNPs para um volume final de 40 μ L. A preparação das amostras foi feita pipetando 27 μ L das soluções de bionanoconjugados e adicionando 3 μ L de glicerol. Estas amostras foram introduzidas nos poços do gel e realizada uma electroforese horizontal para cada tipo de AuNPs dos bionanoconjugados, usando solução tampão de corrida TAE pH 8 e correndo o gel durante 30 minutos a 150 V.

Capítulo III: Apresentação e discussão dos resultados

3.1 Tirosinase livre

3.1.1 Determinação da concentração de proteína total

As primeiras preparações enzimáticas realizadas no laboratório basearam-se no valor de unidades por mL e mg de enzima total, indicados no frasco de tirosinase, calculando então a quantidade a pesar para obter as unidades de enzima pretendidas para a solução. Observou-se, no entanto, que ocorria perda de material nas operações de pesagem, pelo que o conteúdo do frasco de tirosinase foi dissolvido em solução de tampão fosfato pH 7. De modo a determinar com exatidão a concentração de proteína total, não só nesta solução *stock*, mas também das alíquotas já entretanto preparadas, foi realizado um ensaio de BCA. Na figura 3.1 encontra-se a reta de calibração obtida com uma solução padrão de BSA.

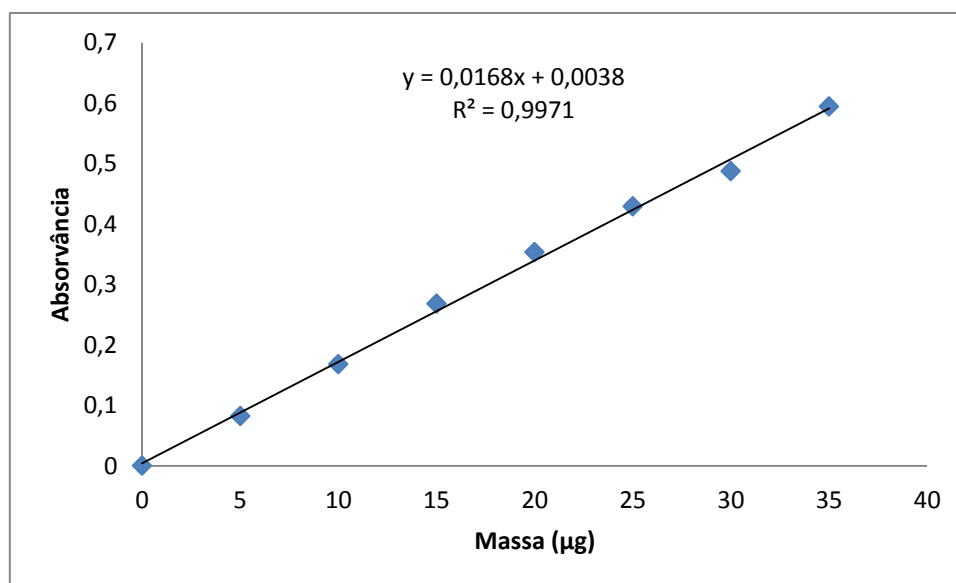


Figura 3.1 - Recta de calibração para o ensaio de determinação da concentração de proteína total pelo método de BCA.

A partir da equação da recta de calibração obtida, $y = 0,0168x + 0,0038$, substituindo em y pelo valor da absorvância das amostras é possível calcular o valor de x e, consequentemente, a concentração de proteína. Os valores de concentração obtidos para as amostras encontram-se na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Valores de concentração das diferentes soluções de tirosinase determinados nas várias amostras preparadas.

Amostra	Concentração (mg/mL)
<i>Stock</i> (frasco)	1,8
Alíquota A	0,01
Alíquota B	0,16
Alíquota C	0,78

Ao longo do trabalho experimental foi necessário realizar novas preparações enzimáticas e como tal novos ensaios de BCA. Sempre que seja efectuada mudança de solução de tirosinase, tal será explicitado ao longo do trabalho.

3.1.2 Determinação da atividade enzimática

Para determinar qual o substrato adequado para prosseguir o trabalho experimental, começou por determinar-se a atividade específica da tirosina. Os substratos estudados foram a tirosina, L-DOPA e 4-metilcatecol, seguindo protocolos padrão da *Sigma* (apêndice I).

Para o substrato tirosina, realizaram-se dois ensaios separados, um oxigenando a solução de substrato entre 3 a 5 minutos e um segundo ensaio em que não foi realizado este passo de oxigenação (Figura 3.2 e 3.3).

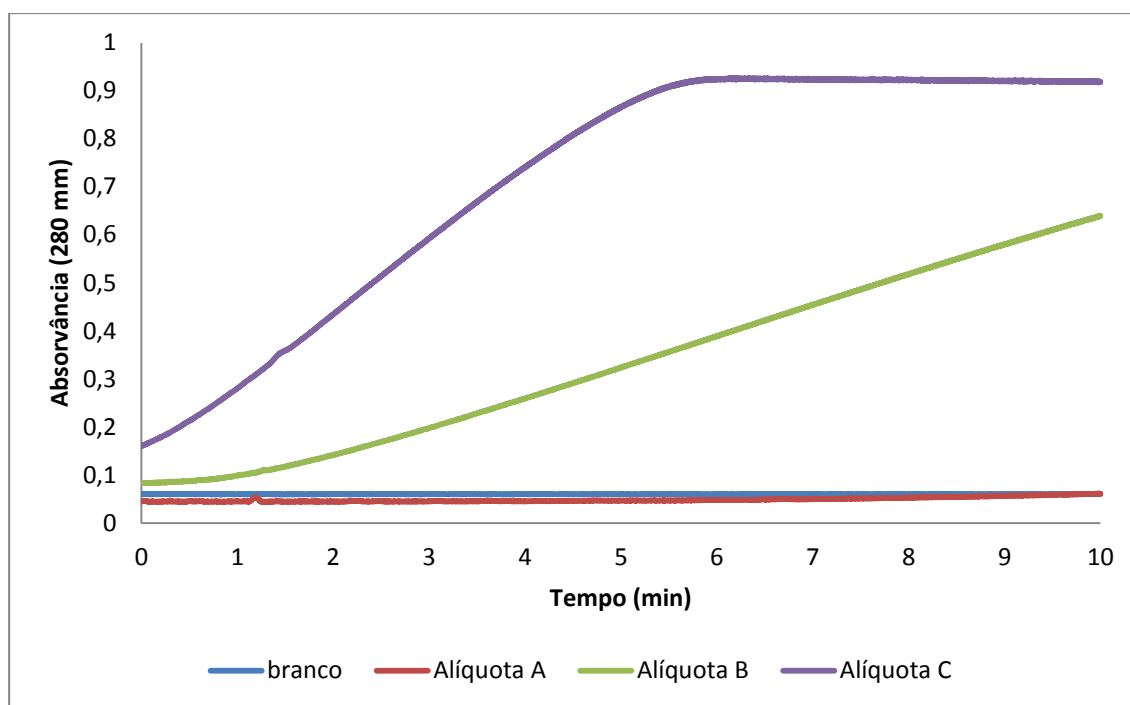


Figura 3.2 – Ensaios efetuados para a determinação da atividade específica das diferentes soluções de tirosinase, utilizando tirosina como substrato e sem oxigenação da solução antes do início do ensaio.

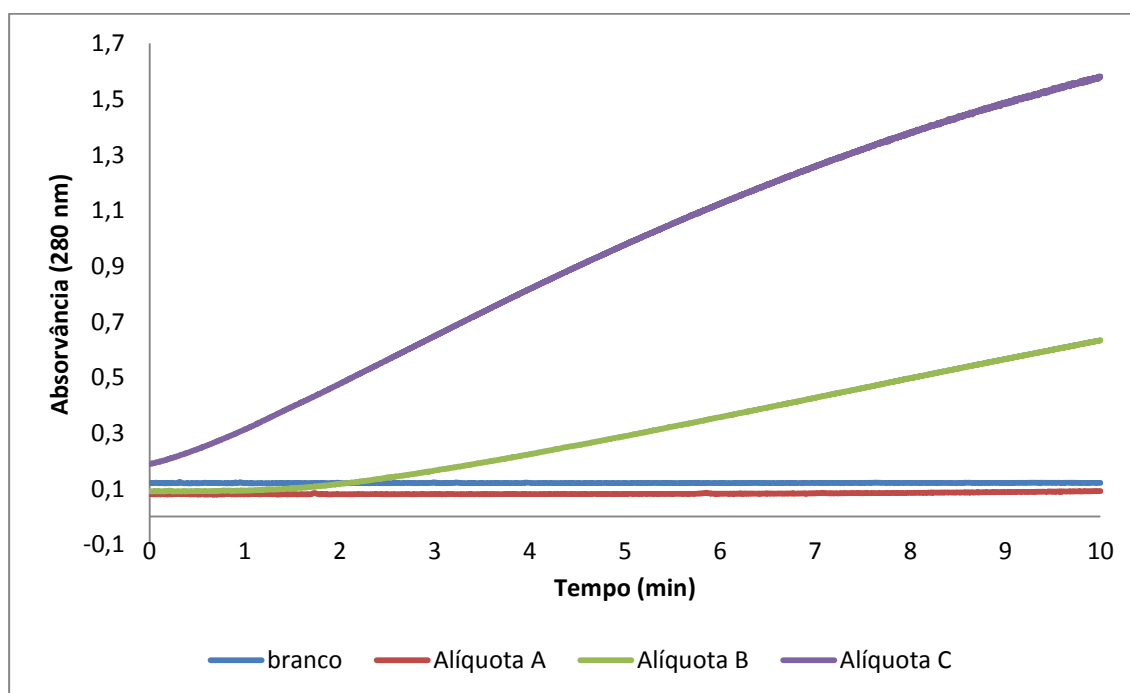


Figura 3.3 - Ensaios efetuados para a determinação da atividade específica das diferentes soluções de tirosinase, utilizando tirosina como substrato e com oxigenação da solução antes do início do ensaio.

Tabela 3.2 – Atividade específica das diferentes soluções preparadas de tirosinase determinadas utilizando tirosina como substrato.

Amostra	Atividade específica (U/mg) – ensaio sem oxigenação	Atividade específica (U/mg) – ensaio com oxigenação
Alíquota A	37	11
Alíquota B	635	646
Alíquota C	1407	1587

Comparando as atividades registadas pelas amostras, observa-se que saturando a solução de tirosina com oxigénio, a enzima possui maior actividade relativamente à oxidação do substrato monofenólico. Tal seria de esperar, pois a reacção ocorre utilizando oxigénio e como tal, uma maior quantidade de oxigénio molecular disponível em solução leva ao aumento de atividade da enzima. Na figura 3.2 observa-se também que, relativamente à alíquota C (mais concentrada), ao fim de aproximadamente 5 minutos a reacção atinge um patamar, indicando que todo o substrato foi consumido. No entanto, por comparação com a mesma amostra na figura 3.3, observa-se que passados 10 minutos a reacção prossegue e a absorvância registada é superior. Tal poder-se-á dever, novamente, à disponibilidade de oxigénio em solução, que, neste caso, permite que a reacção de oxidação prossiga, ao contrário do observado no outro ensaio, em que a menor concentração de oxigénio limitará a reacção. É possível também observar, nas alíquotas B e C, um período de latência característico da reacção de monofenolase (ou cresolase). No ensaio com alíquota A, não se observou formação de produto. Tal poder-se-á dever à baixa concentração de enzima nesta alíquota, não sendo suficiente para realizar a reacção de monofenolase ou devido à lenta ativação da enzima, devido também à sua baixa concentração.

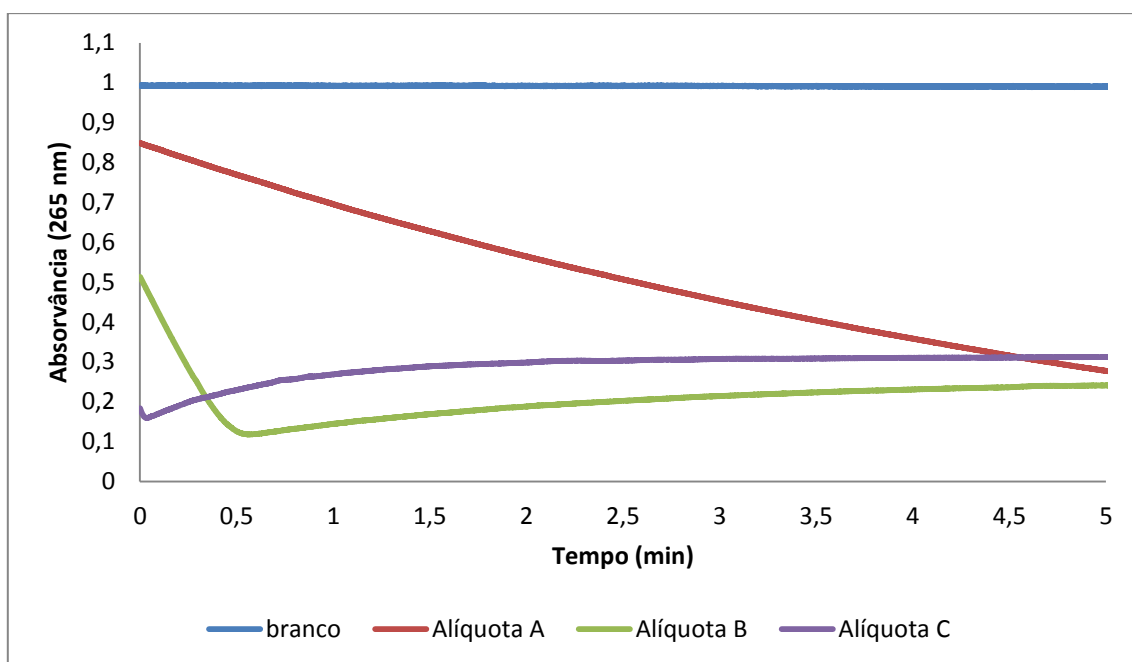


Figura 3.4 - Ensaios efetuados para a determinação da atividade específica das diferentes soluções de tirosinase, utilizando L-DOPA como substrato.

Tabela 3.3 - Atividade específica das diferentes soluções preparadas de tirosinase determinadas utilizando DOPA como substrato.

Amostra	Atividade específica (U/mg)
Alíquota A	1383
Alíquota B	8563
Alíquota C	9940

Relativamente ao substrato L-DOPA, verifica-se, na figura 3.4, que a alíquota de tirosinase de baixa concentração (alíquota A) é capaz de catalisar a reação de difenolase, apesar da mesma concentração de enzima não formar produto reacional durante o mesmo período de tempo, na reação de monofenolase (figura 3.2). Tal poderá dever-se ao facto dos difenóis serem melhores nucleófilos que monofenóis ^[104] e, desta forma, a ligação do grupo OH do substrato difenólico ao átomo de cobre ocorrer mais rapidamente que num substrato monofenólico. Poderá também dever-se ao período de latência da enzima até assumir a sua forma ativa *desoxi*, algo que é característico da reação de monofenolase e ausente da reação de difenolase ^[79,104].

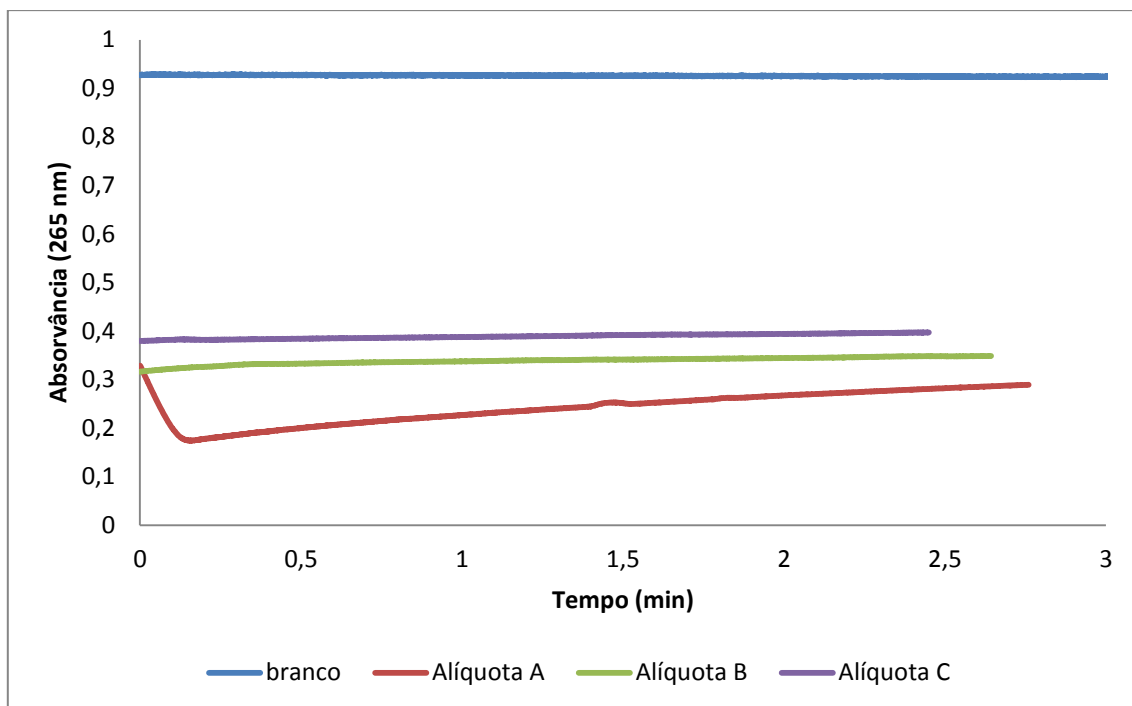


Figura 3.5 - Ensaios efetuados para a determinação da atividade específica das diferentes soluções de tirosinase, utilizando 4-metilcatecol como substrato.

Tabela 3.4 – Atividade específica das diferentes soluções preparadas de tirosinase determinadas utilizando 4-metilcatecol como substrato.

Amostra	Atividade específica (U/mg)
Alíquota A	12991
Alíquota B	-
Alíquota C	-

No ensaio da determinação da atividade da tirosinase referente ao substrato 4-metilcatecol, não foi possível o cálculo das mesmas para as alíquotas mais concentradas, B e C. Neste caso, tal poder-se-á dever ao facto de que nestas alíquotas a concentração de enzima ser demasiado elevada. Neste ensaio, o seguimento da formação do produto reaccional, 4-metil-*o*-benzoquinona, é feito indiretamente. Esta quinona, à medida que vai sendo formada, oxida o ácido ascórbico, em solução, resultando na diminuição de absorvância ^[105], no comprimento de onda seleccionado para este ensaio, 265 nm. Nos ensaios com alíquotas B e C, não se terá observado oxidação de ácido ascórbico pois a reacção terá ocorrido quase instantaneamente, possivelmente devido à maior concentração de enzima nestas alíquotas, e como tal, o produto é formado mais rapidamente. Tal pode ser corroborado

observando o ensaio com a alíquota C (figura 3.4), onde se observa que a oxidação do ácido ascórbico ocorre de forma extremamente rápida e quase não observável.

Comparativamente com o substrato L-DOPA, as alíquotas de tirosinase apresentam maior atividade para 4-metilcatecol. Esta maior especificidade pode ser explicada pela ausência de impedimento estérico na ação da enzima sobre este substrato, sendo ambos nucleófilos semelhantes [104].

Nos ensaios com os substratos difenólicos não foi efetuado o ensaio adicional saturando a solução com oxigênio devido à rapidez com que as soluções de substrato começavam a auto oxidar.

De modo a observar de que forma a atividade da enzima variava com a concentração da mesma, foram efetuados ensaios com diferentes diluições da solução de tirosinase menos concentrada. Para estes ensaios foram apenas utilizados os substratos difenólicos visto terem apresentado maior valor de unidades de enzima ativa, comparativamente com tirosina.

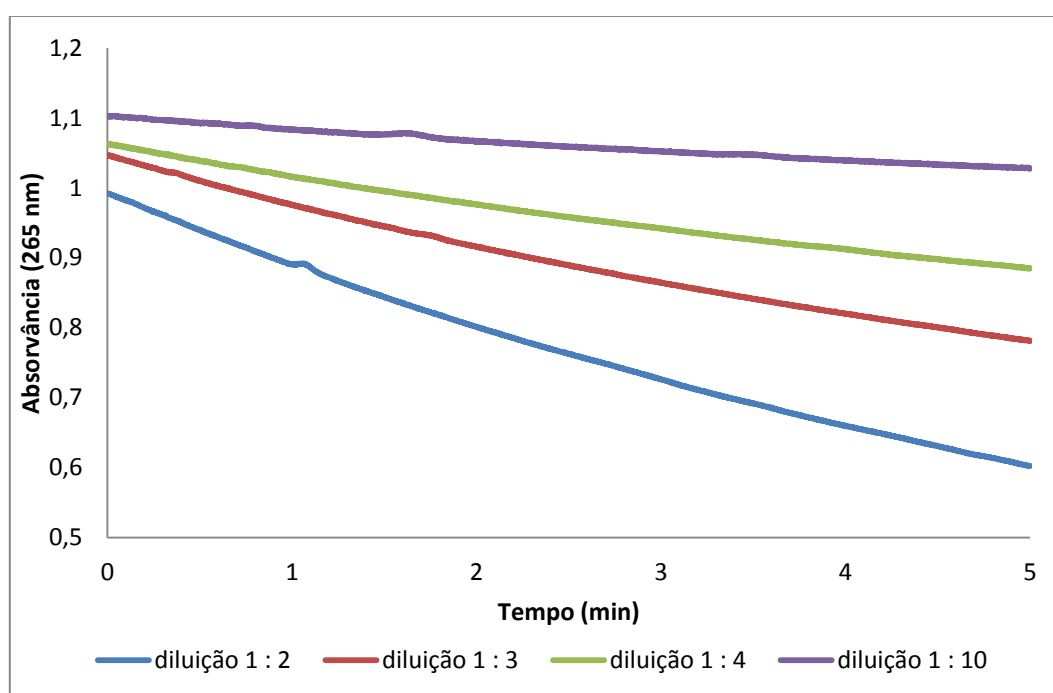


Figura 3.6 – Ensaio para a determinação da atividade específica de tirosinase, efetuando três diferentes diluições da alíquota C e utilizando L-DOPA como substrato.

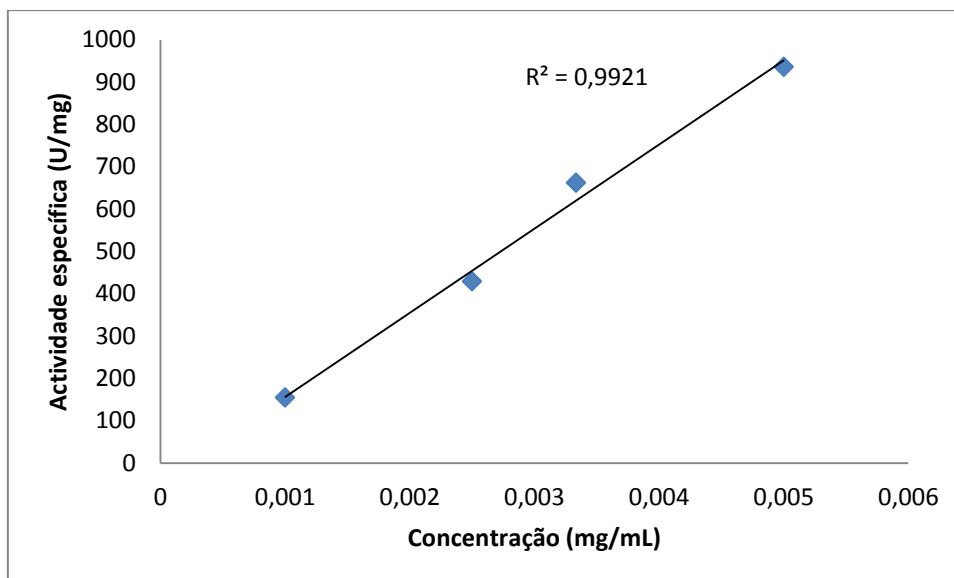


Figura 3.7 - Variação da atividade específica da tirosinase com a diluição da solução utilizada. L-DOPA foi usado como substrato nos ensaios.

Analisando as figuras 3.6 e 3.7 pode-se verificar que a atividade da tirosinase varia de forma linear com a concentração da enzima. Deste modo, é possível concluir que caso seja necessário diluir a enzima na sua preparação ou durante um ensaio enzimático na própria *cuvette*, é de esperar que a atividade da tirosinase varie de forma linear com a diluição efetuada e não ocorram alterações de atividade inesperadas.

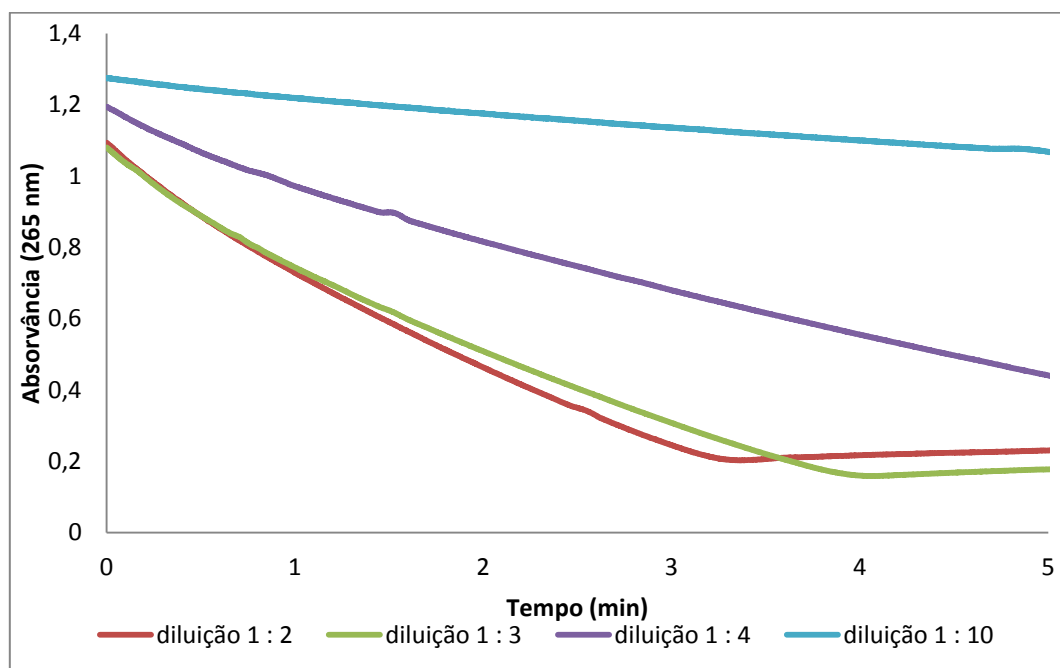


Figura 3.8 - Ensaios para a determinação da atividade específica de tirosinase, efetuando três diferentes diluições da alíquota C e utilizando 4-metilcatecol como substrato.

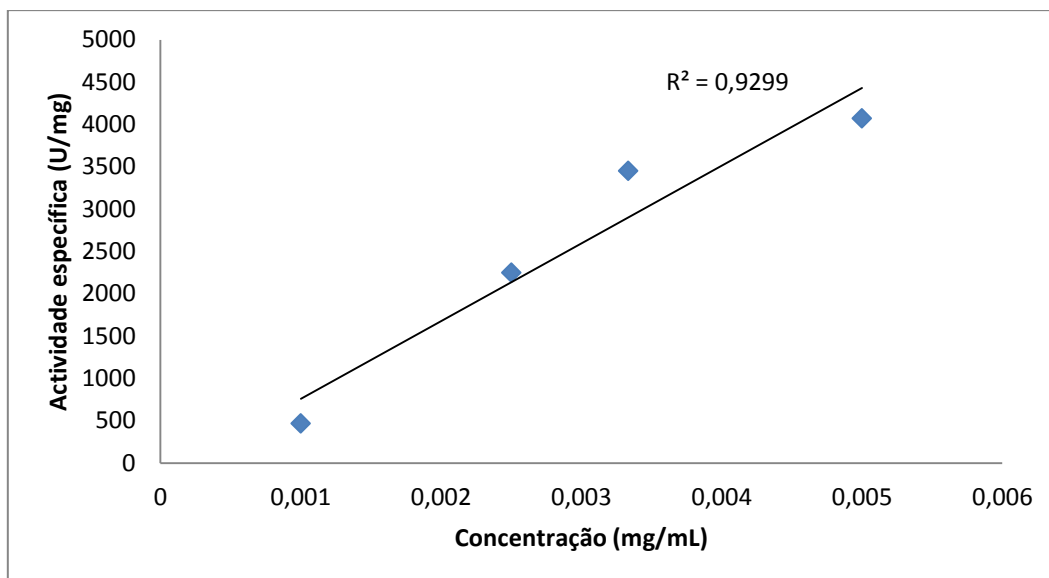


Figura 3.9 - Variação da atividade específica da tirosinase com a diluição da solução utilizada. 4-metilcatecol foi usado como substrato nos ensaios.

Analisando as figuras 3.8 e 3.9 é possível concluir que, tal como observado para L-DOPA, a atividade da tirosinase varia de forma linear com a concentração da enzima, neste caso utilizando como substrato o 4-metilcatecol. É possível também observar que ao longo das diluições efetuadas, a atividade da tirosinase é bastante superior para o substrato 4-metilcatecol relativamente a L-DOPA.

No entanto, devido à variação em alguns pontos na atividade calculada (figura 3.9), foram efetuados novos ensaios, efetuando um maior número de diluições. Foi preparada novamente uma solução de tirosinase com 0,01 mg/mL e utilizado 4-metilcatecol como substrato.

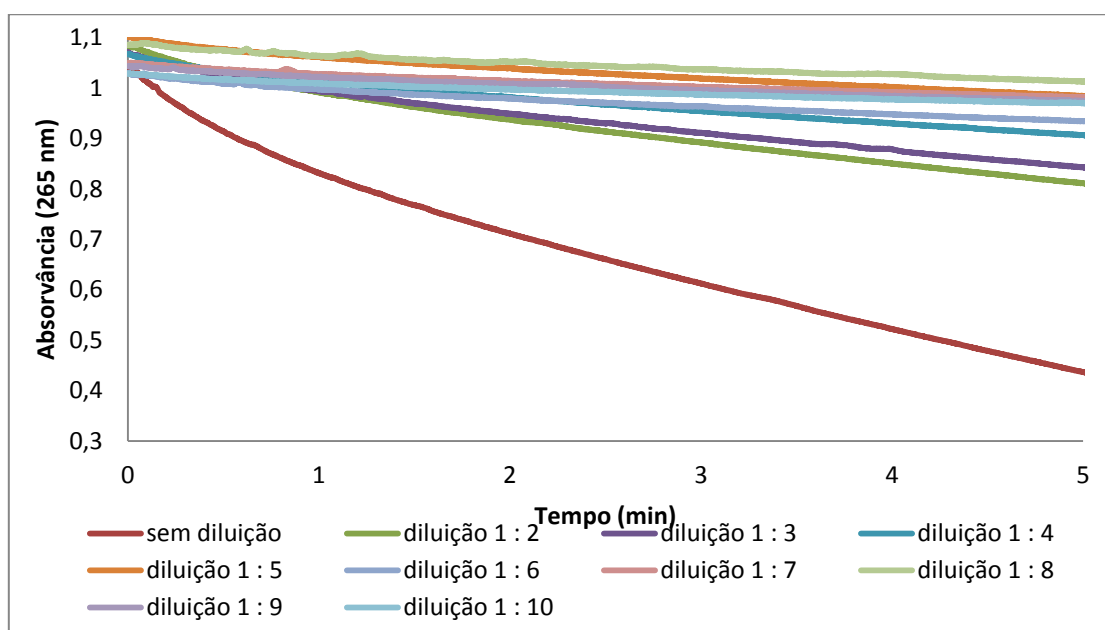


Figura 3.10 – Ensaios para a determinação da atividade específica de tirosinase, efetuando nove diferentes diluições da alíquota C e utilizando 4-metilcatecol como substrato.

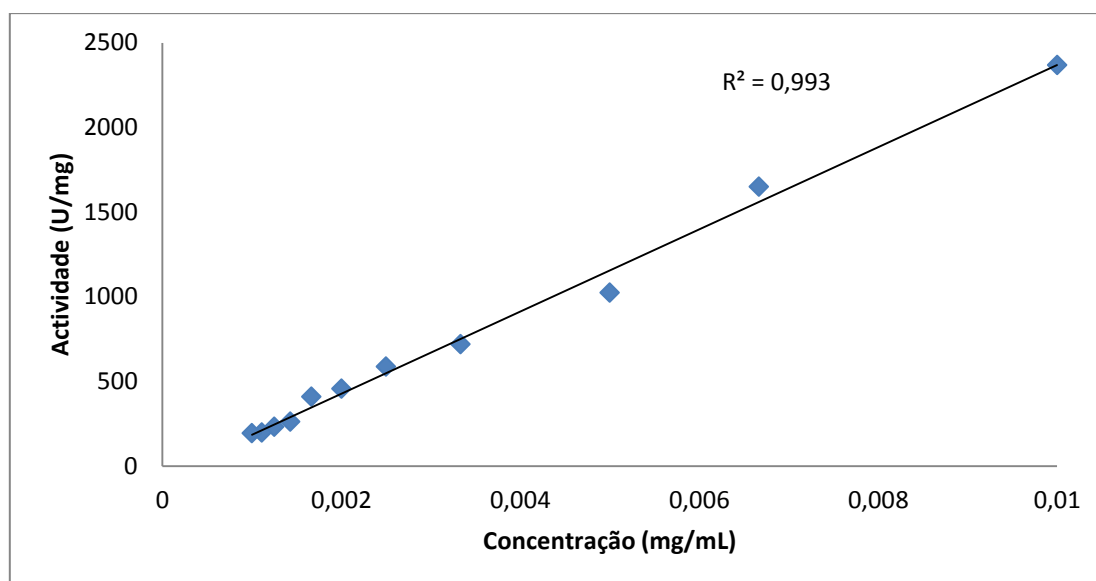


Figura 3.11 – Variação da atividade específica da tirosinase com a diluição da solução utilizada. 4-metilcatecol foi usado como substrato nos ensaios e foram efetuadas nove diferentes diluições da alíquota C de tirosinase.

Analisando a figura 3.11 foi possível confirmar que a atividade da tirosinase varia linearmente com a concentração da enzima. Observa-se também que a atividade calculada é inferior à calculada anteriormente para tirosinase não diluída (alíquota A, tabela 3.4) e para enzima diluída 2, 3, 4 e 10 vezes (figura 3.9). Estes valores de atividade poderão dever-se ao facto da enzima perder atividade sempre que a solução é descongelada. Visto ter sido preparada uma alíquota de tirosinase a partir de uma solução mãe mais concentrada, é possível que o descongelamento da mesma tenha levado à perda de atividade. Outra possível explicação poderá estar relacionada com a preparação da alíquota de enzima, ao não ter sido agitada eficazmente a solução mãe, isso poderá ter levado a que o volume pipetado de enzima fosse inferior ao pretendido. Este facto não invalida, no entanto, os resultados obtidos pois todas as diluições foram efectuadas a partir da alíquota de enzima preparada (0,01 mg/mL).

Após obtenção dos valores de atividade específica de tirosinase para cada substrato, decidiu-se prosseguir o estudo utilizando 4-metilcatecol pois, não só requer uma menor quantidade de enzima para ensaios, como também a tirosinase apresenta maior atividade específica para este substrato. Decidiu-se também utilizar a solução de tirosinase de concentração 0,01 mg/mL, nos ensaios seguintes para a enzima na sua forma livre em solução, que apesar à sua baixa concentração apresenta actividade específica alta relativamente a 4MC e permite economizar nos gastos de enzima. Desta forma, são também reduzidos os custos experimentais visto serem necessários menores concentrações de enzima e substrato mas mantendo a integridade e qualidade dos resultados.

3.1.3 Determinação do coeficiente de extinção molar de 4-metilcatecol

Após seleção do substrato para os ensaios enzimático foi necessário determinar o comprimento de onda a que o produto da reação, 4-metil-*o*-benzoquinona, absorve radiação de forma a ser possível a sua quantificação. De modo a quantificar o produto formado pela reação enzimática foi também necessário determinar o seu coeficiente de extinção molar.

Para a determinação do comprimento de onda a ser usado nos ensaios enzimáticos foi preparada uma solução de 4MC, adicionou-se enzima e foram recolhidos espectros ao longo do tempo até não ocorrer alteração do máximo de absorção.

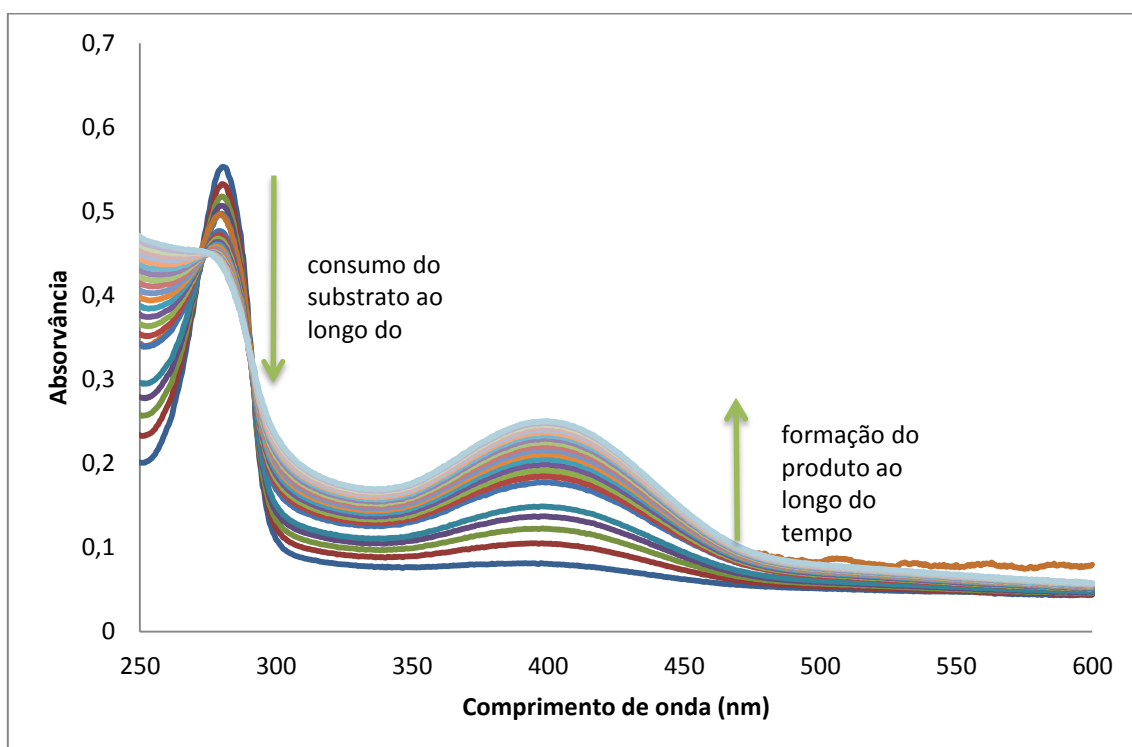


Figura 3.12 – Espectros obtidos para a reação de oxidação de 4-metilcatecol com formação de 4-metil-*o*-benzoquinona. Espectros obtidos de 10 em 10 segundos até não ocorrer alteração do máximo de absorção a 400 nm.

Os espectros obtidos (figura 3.12) evidenciam o consumo de substrato, a 280 nm, e formação do produto ao longo do tempo, a 400 nm. A ausência de pontos isobésticos perto do comprimento de onda do produto formado poderá ser indicativa da formação de quinonas, pouco estáveis ^[106]. A ausência de um ponto isobético perto de este comprimento de onda indica que a concentração a utilizar nos estudos não deveria ser demasiado elevada, de forma a não propiciar a reação entre quinonas formadas ^[106]. Aproximadamente a 273 e 290 nm observam-se dois pontos isobésticos correspondentes à conversão direta entre substrato e produto.

Para o prosseguimento do estudo foi escolhido o comprimento de onda de 400 nm, tendo sido determinado o coeficiente de extinção molar da respectiva quinona, 4-metil-*o*-benzoquinona, para este comprimento de onda. Para tal foram preparadas soluções de 4MC entre 0,5 e 5 mM, pipetando 100 μ L para a *cuvette* e sendo ajustada, nos cálculos, a concentração das mesmas para o volume reaccional final de 3 mL. Após atingido o máximo de absorvância da reação, monitorizando o comprimento de onda de 400 nm, assumindo que todo o substrato foi convertido a produto, é feita uma representação dos valores de absorvância em função da concentração (figura 3.13). O valor do coeficiente de extinção molar foi obtido do declive da reta.

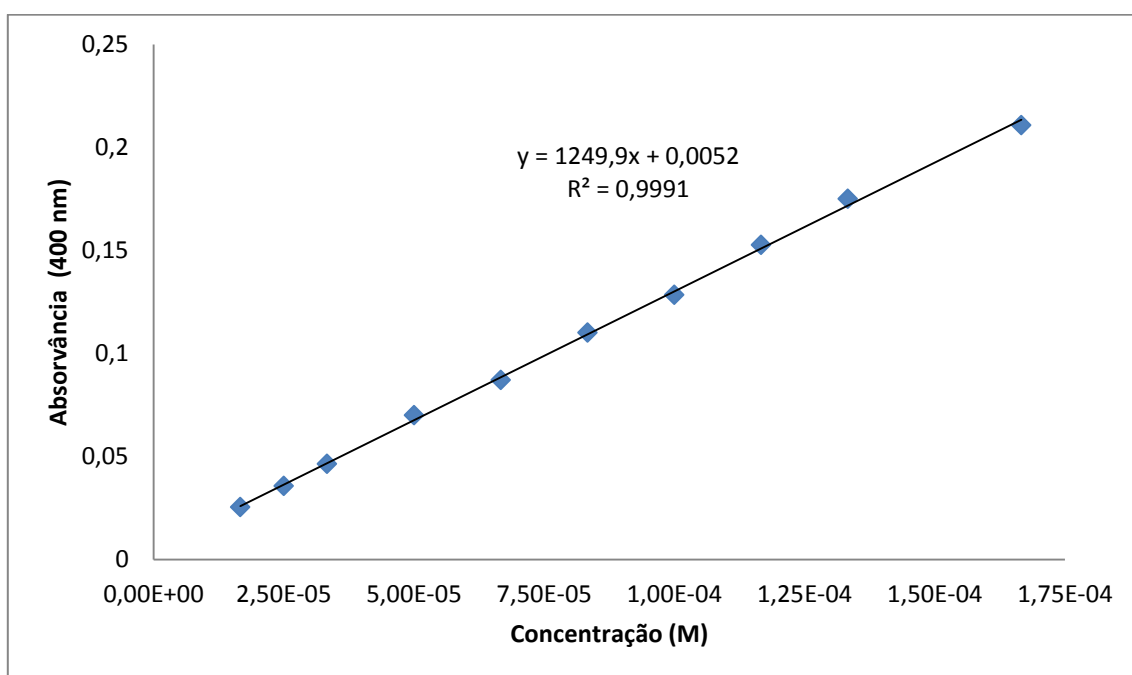


Figura 3.13 - Representação dos valores de absorvância a 400 nm em função de diferentes valores de concentração de substrato convertido a produto, a pH 7.

O valor obtido para o coeficiente de extinção molar, a pH 7 e a 400 nm, foi determinado como sendo $1250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor ligeiramente superior ao valor referido em literatura^[107] para este valor de pH, $1010 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Devido à mudança de pH da solução tampão para determinação do pH ótimo de funcionamento da enzima, o coeficiente de extinção molar a 400 nm foi recalculado para o pH de 6,5 (figura 3.14), visto ter sido este o valor de pH das soluções utilizadas no decorrer do trabalho experimental. Neste ensaio o volume total reaccional foi de 1,1 mL, tendo sido utilizados 50 μ L de solução de tirosinase e 50 μ L de soluções de 4MC preparadas com concentração entre 60 μ M e 6 mM. Estas soluções foram adicionadas ao volume de 1 mL de solução tampão fosfato pH 6,5 e a metodologia seguida foi a mesma que para o ensaio anterior. Para este valor de pH, o valor do

coeficiente de extinção molar, a 400nm, determinado foi $1305 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor este também de acordo com a literatura para pH 6,5 ^[107], em que o coeficiente foi determinado como tendo o valor de $1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

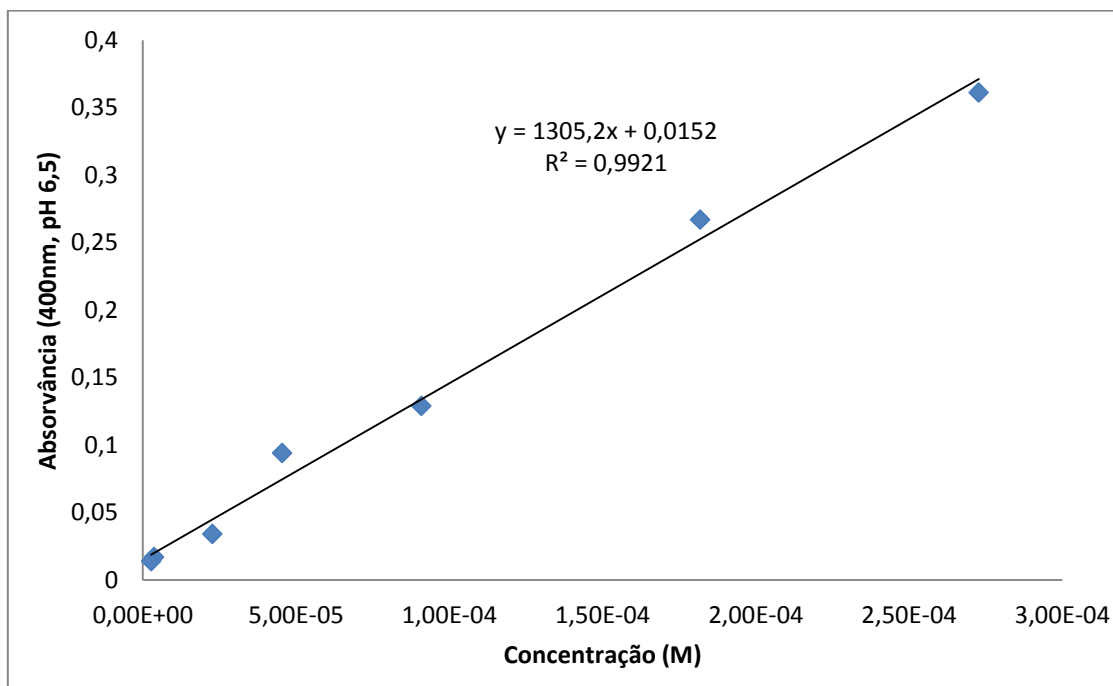


Figura 3.14 - Linearização dos valores de absorvância a 400 nm em função de diferentes valores de concentração de substrato convertido a produto, a pH 6,5.

3.1.4 Otimização das condições experimentais

3.1.4.1 Oxigenação da solução de substrato

Determinou-se experimentalmente a necessidade, ou não, de saturar a solução reacional (solução tampão e substrato) com oxigênio antes de cada ensaio. Para tal foram feitos dois ensaios, em que uma solução foi oxigenada durante 3 minutos e uma segunda solução em que este passo não foi efetuado. Após a adição da enzima, a atividade enzimática foi monitorizada a 400 nm (figura 3.15).

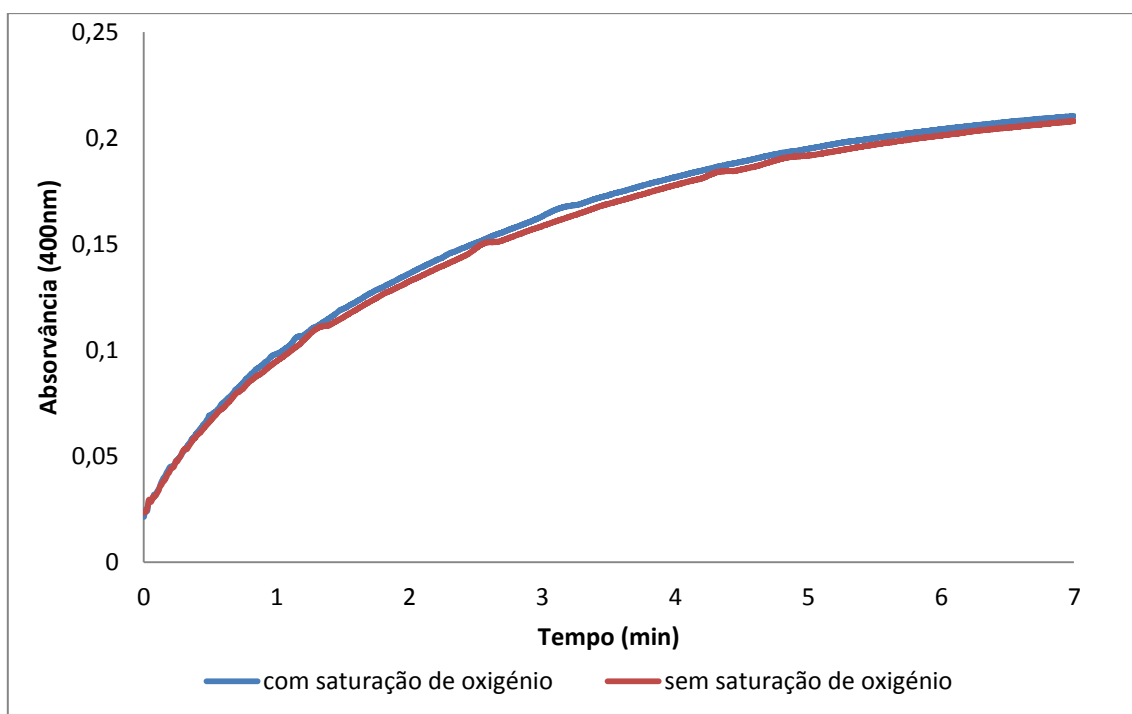


Figura 3.15 – Reações de oxidação de 4-metilcatecol com e sem oxigenação da solução reacional, seguindo a formação de produto ao comprimento de onda de 400 nm.

Tabela 3.5 – Valores de velocidade inicial para as reações de oxidação de 4-metilcatecol, com e sem oxigenação da solução reacional.

Ensaio	Velocidade inicial (μM/s)
Com oxigenação da solução	1,25
Sem oxigenação da solução	1,18

Observa-se que ambas as reações têm um comportamento semelhante e não se verificam diferenças significativas. Tal pode ser confirmado através do cálculo da velocidade inicial de ambas as reações (tabela 3.5), onde se verifica que a oxigenação da solução aumentou ligeiramente a velocidade inicial da reação. Seria de esperar que a oxigenação da solução reacional aumentasse a atividade da enzima, como verificado para o substrato tirosina (em 3.2.1) na reação de monofenolase.

Foram também realizados ensaios para a determinação da atividade específica da tirosinase, com uma solução saturada com oxigênio e outra sem esta saturação de oxigênio. Consultando a tabela 3.6 pode verificar-se que a oxigenação da solução levou a um aumento ligeira de atividade específica de tirosinase com o substrato 4MC. No entanto, a diferença de unidades por mL calculadas entre os dois ensaios, 44 U/mg, não apresenta uma melhoria substancial da atividade da tirosinase.

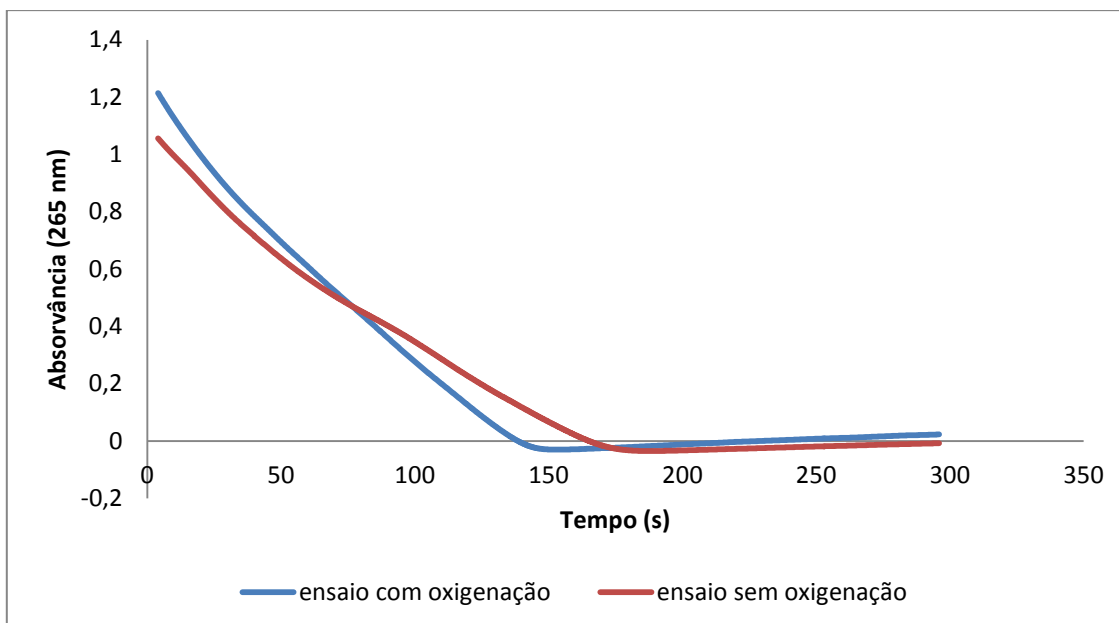


Figura 3.16 – Ensaios para a determinação da atividade específica da tirosinase nas reações de oxidação de 4-metilcatecol, com e sem oxigenação da solução reaccional.

Tabela 3.6 – Atividade específica da tirosinase determinada para as reações de oxidação de 4-metilcatecol, com e sem oxigenação da solução reaccional.

Ensaio	Actividade (U/mg)
Com oxigenação da solução	133
Sem oxigenação da solução	99

Com estes resultados concluiu-se que não seria necessário realizar o passo de saturação da solução com oxigénio para os ensaios cinéticos que usam 4MC como substrato.

3.1.4.2 Determinação do pH ótimo de funcionamento de tirosinase

Para determinação do pH ótimo de funcionamento da tirosinase, foi preparada uma mistura de soluções tampão que abrangesse a gama de valores de pH entre 2 e 10.

Na preparação da solução de substrato com a solução com o valor de pH pretendido, observou-se que a valores de pH mais alcalinos esta mudava de incolor para uma coloração roxa ou alaranjada (figura 3.17), instantaneamente para valores de pH entre 9 e 10. Consequentemente foram

obtidos espectros para estas soluções de substrato, após a sua preparação e após 24 horas, de modo a elucidar o que estaria a ocorrer na solução (figuras 3.18 e 3.19).

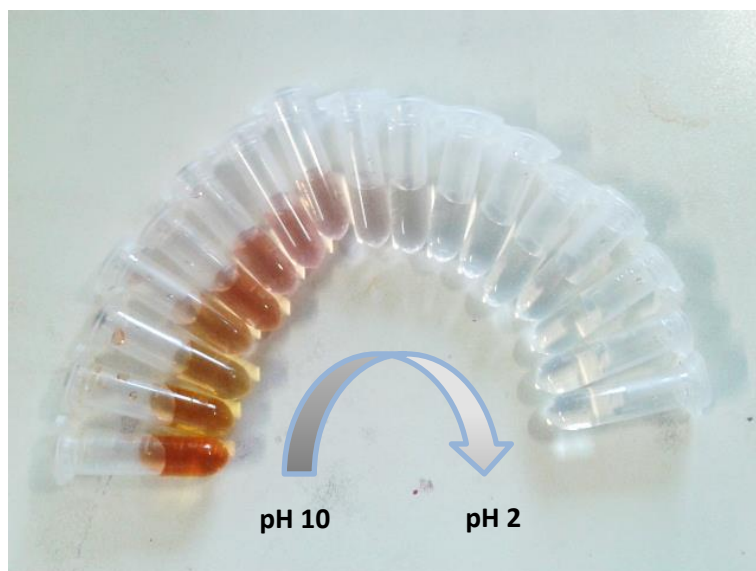


Figura 3.17 – Aspeto das diferentes soluções de 4-metilcatecol após 10 horas após a sua respectiva preparação. O valor de pH entre cada solução preparada é de 0,5.

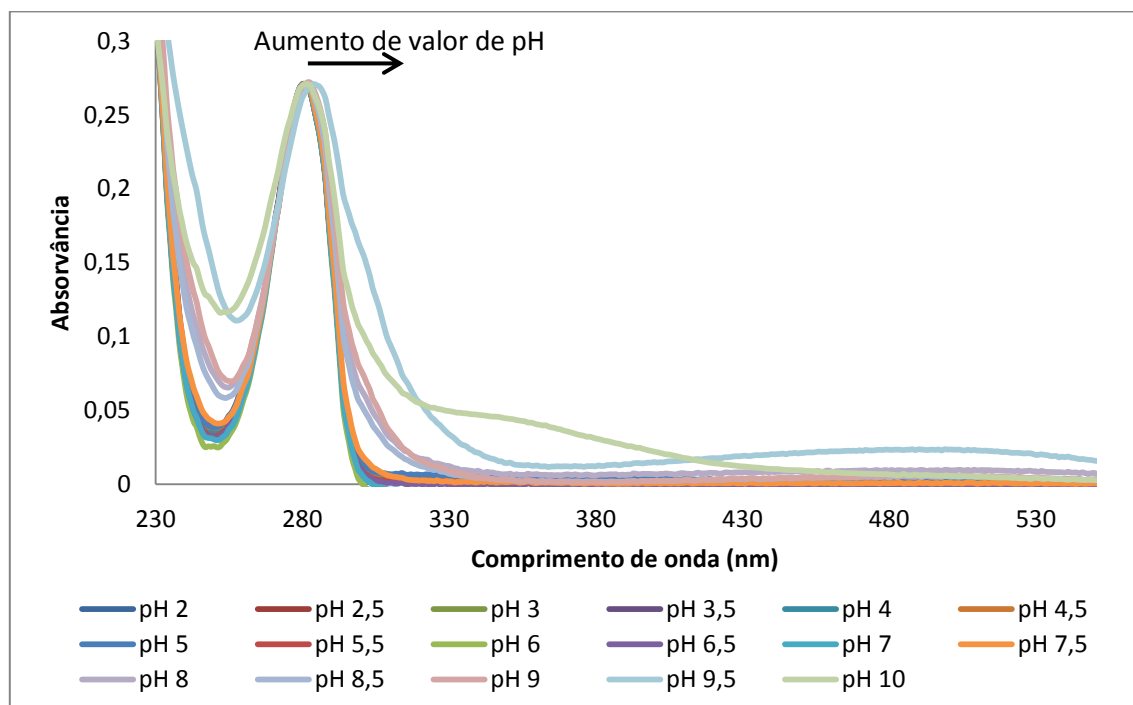


Figura 3.18 – Espectros normalizados das soluções de 4-metilcatecol a diferentes valores de pH, realizados imediatamente após a preparação da respetiva solução.

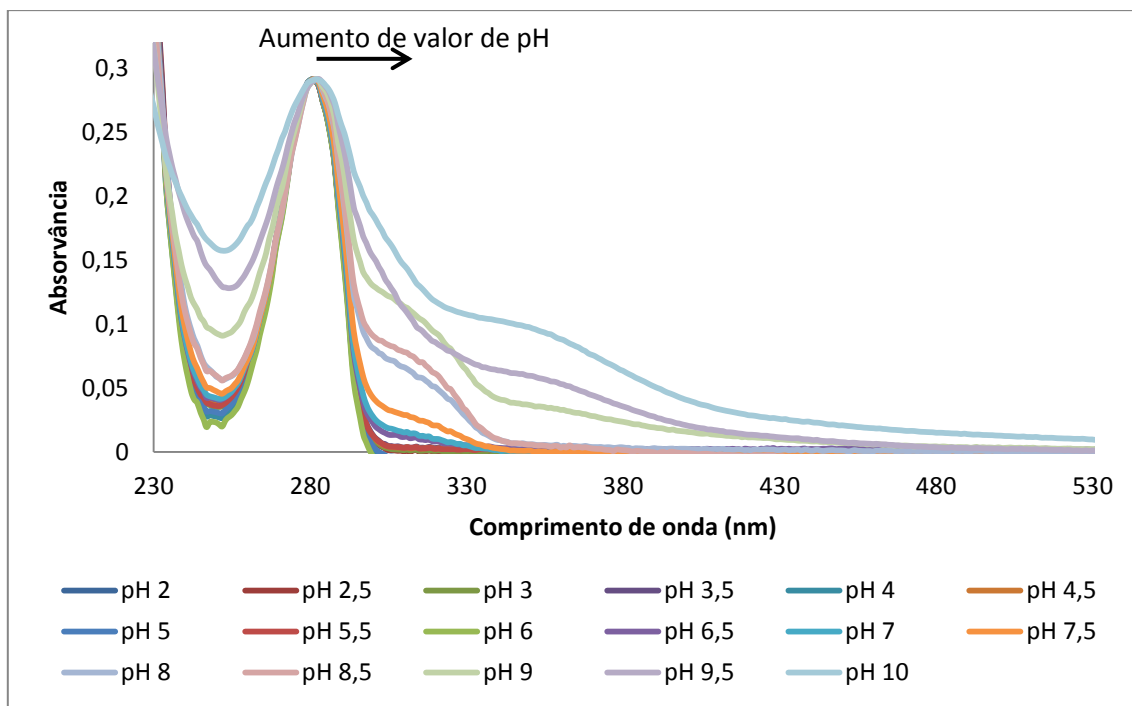


Figura 3.19 - Espectros normalizados das soluções de 4-metilcatecol a diferentes valores de pH, realizados 24 horas após a preparação da respectiva solução.

Relativamente aos espectros obtidos imediatamente após a preparação das respectivas soluções de substrato (figura 3.18), observa-se que para soluções com valor de pH acima de 8 existe um alargamento de banda e o aparecimento de um máximo de absorção a 480 nm, para pH 9,5 e a 350 para pH 10. O aparecimento desta nova banda estará associada à auto oxidação do substrato e, como tal, à mudança de cor da solução. Observando os espectros obtidos passadas 24 horas (figura 3.19), verifica-se que o aparecimento da banda entre o comprimento de onda 316 e 350 nm começa a ocorrer para soluções de pH acima de 5,5, ou seja, que passado um dia estas soluções já se encontram oxidadas. A rápida oxidação deste composto, a valores de pH mais alcalinos, é algo já evidenciada na literatura ^[65].

Como tal, para os ensaios de determinação de pH ótimo, não foram feitos ensaios com soluções de pH 9,5 e 10 devido à presença das bandas mencionadas atrás que poderiam afetar os resultados obtidos. Concluiu-se também que as soluções de substrato a utilizar em todos os ensaios futuros seriam preparadas no próprio dia, preferencialmente o mais perto possível do início dos mesmos.

Os ensaios para a determinação do pH ótimo da tirosinase foram efetuados a 25 °C e a metodologia utilizada foi a mesmo que no tópico 3.1.4.2. Analisando a figura 3.20 observa-se que para valores de pH abaixo de 4,5 a tirosinase encontra-se inactiva, sendo activada a partir de pH 5 e atingindo o valor máximo de velocidade inicial a pH 6,5. A partir deste ponto a atividade da tirosinase

decrece e a partir de pH 7,5 não apresenta variação mas é relativamente pouco ativa. Conclui-se que a tirosinase apresenta maior actividade a pH 6,5 sendo este o seu pH ótimo de funcionamento.

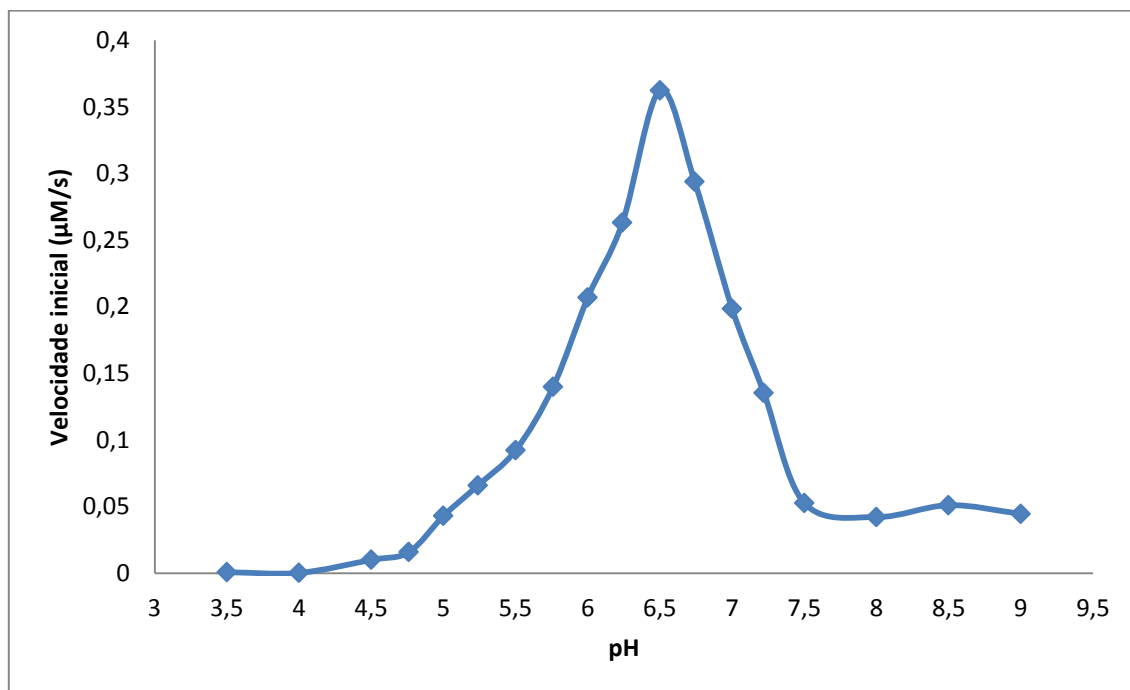


Figura 3.20 – Valores de velocidade inicial da reação de oxidação de 4-metilcatecol em função do valor de pH da respetiva solução, para a determinação do pH ótimo de actividade da tirosinase. Ensaios realizados a 25 °C e com concentração final de substrato 167 μM .

3.1.4.3 Determinação da temperatura ótima de funcionamento de tirosinase

Para determinar qual temperatura ótima de funcionamento da enzima, foi calculado o valor de velocidade inicial da reação numa gama de temperaturas de 5 a 70 °C. Os ensaios foram realizados com solução tampão de fosfato de potássio pH 7. Devido a este valor de pH, a solução tampão utilizada no restante trabalho foi apenas fosfato de potássio em vez da mistura preparada, visto esta solução funcionar como tampão entre pH 6 e 8.

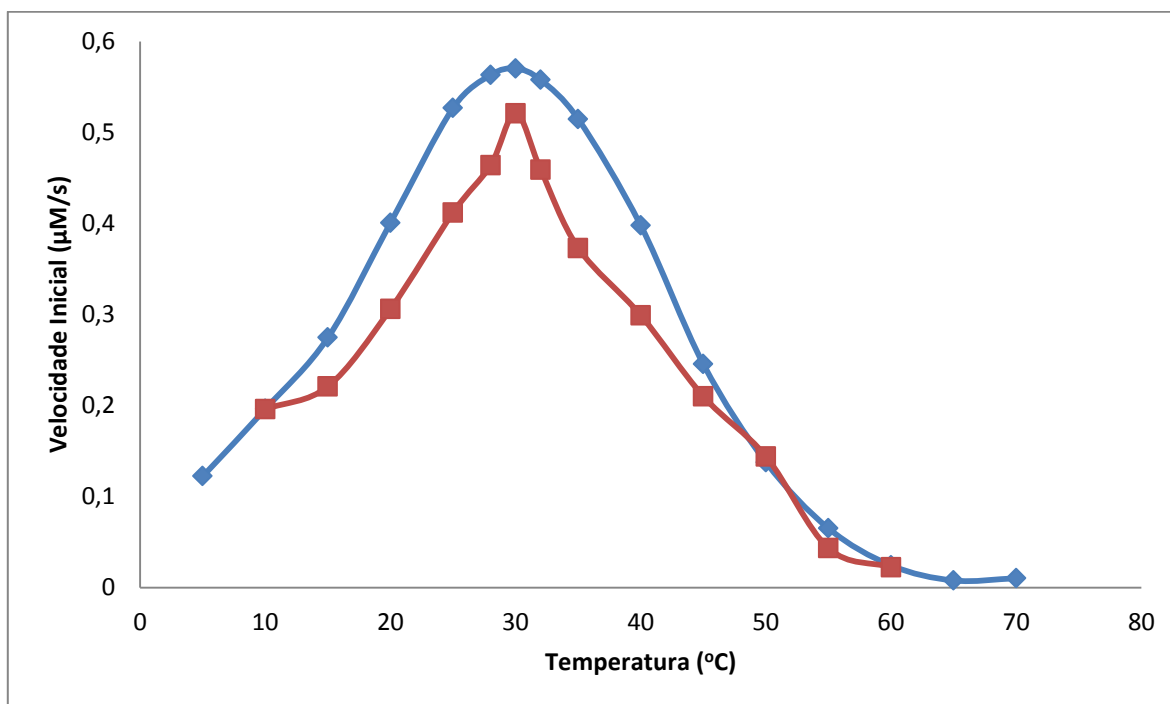


Figura 3.21 - Valores de velocidade inicial da reação de oxidação de 4-metilcatecol em função do valor de temperatura do respectivo ensaio, para a determinação de temperatura ótima de atividade da tirosinase. Ensaios realizados com concentração final de substrato 167 μM . A azul encontram-se os ensaios efetuados com solução de tampão fosfato a pH 7; a vermelho encontram-se os ensaios efetuados com mistura de soluções tampão a pH 6,5.

Analisando a figura 3.21, observa-se que a atividade da tirosinase é maior entre 25 e 35 $^{\circ}\text{C}$ atingindo o máximo absoluto a 30 $^{\circ}\text{C}$.

Devido à realização dos ensaios para a determinação de pH ótimo da tirosinase terem sido efetuados com uma mistura de soluções tampão, os ensaios para a determinação de temperatura ótima foram repetidos, desta vez com a mesma mistura de soluções tampão utilizada. Na figura 3.21 observa-se que para este ensaio, o perfil da dependência da velocidade inicial com a temperatura do ensaio é diferente do observado no ensaio utilizando solução tampão de fosfato pH 7. É possível também verificar que o valor de temperatura ótima neste ensaio permanece nos 30 $^{\circ}\text{C}$, tal como no ensaio anterior.

Comparando o valor de velocidade inicial a pH 7 na figura 3.20, com o valor de velocidade inicial na figura 3.21 para a solução de mistura de soluções tampão pH 6,5 a 25 $^{\circ}\text{C}$, seria de esperar que apresentassem valores semelhantes visto que os ensaios foram realizados nas mesmas condições. Verifica-se, no entanto, que o valor da figura 3.20 é cerca de metade do observado na figura 3.21. Esta discrepância poderá dever-se ao ajuste efetuado nas soluções individuais de pH, antes de serem

adicionadas ao substrato em pó, com soluções diluídas de HCl e NaOH, de modo a obter o valor de pH pretendido, algo que foi feito apenas na solução mãe no ensaio da determinação de temperatura ótima. A adição destas soluções levou ao aumento da força iónica da solução tampão, que, por sua vez, poderá ter levado à diminuição da atividade da enzima. Também na figura 3.21, comparando os dois perfis de atividade, para as duas diferentes soluções, se verifica uma pequena diminuição da velocidade inicial. Apesar de ambas as soluções não se encontrarem ao mesmo valor de pH, seria de esperar que a pH 6,5 a actividade fosse maior visto ser este o valor de pH ótimo de atividade da enzima. Esta diminuição de atividade será também devido à maior força iónica da solução de mistura de soluções tampão comparativamente com a solução de tampão fosfato de potássio. O descongelamento da alíquota de tirosinase poderá levar também a que ocorra perda de atividade da enzima.

Concluiu-se com estes ensaios, que a temperatura ótima para os ensaios com tirosinase será de 30 °C. A utilização de uma solução de mistura de soluções tampão é desnecessária, como também foi concluído em 3.1.4, pois ocorre diminuição da atividade da tirosinase aquando da utilização desta solução.

3.1.5 Ensaio cinéticos

Após otimizadas as condições de reacção, procedeu-se à realização dos ensaios cinéticos, para a enzima na sua forma livre em solução, tendo sido utilizada uma solução tampão de fosfato de potássio 50 mM a pH 6,5. A reacção foi monitorizada ao comprimento de onda de 400 nm durante 10 minutos e realizada à temperatura constante de 30 °C. No fim de cada ensaio foi calculada a velocidade inicial de cada reacção e obteve-se uma curva do tipo *Michaelis-Menten* (figura 3.22). Por fim foram calculados os parâmetros cinéticos K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m (tabela 3.7).

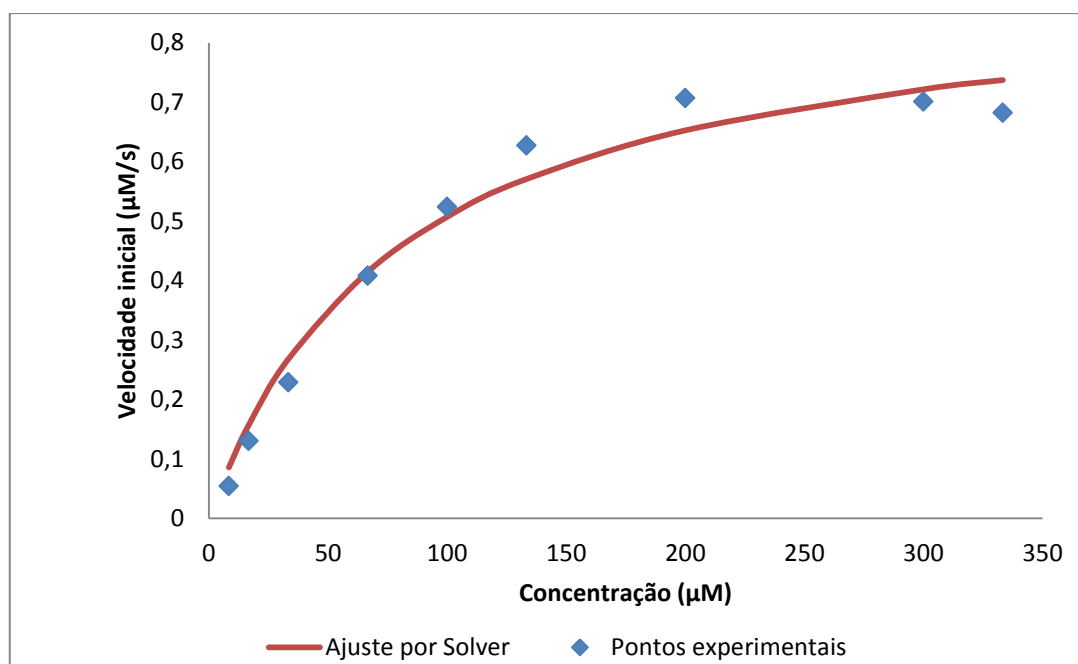


Figura 3.22 – Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função do respetivo valor de concentração de substrato. A azul encontram-se representados os valores experimentais; a vermelho encontra-se representado o ajuste não linear dos valores experimentais efectuado recorrendo à ferramenta *Solver*.

Tabela 3.7 - Parâmetros cinéticos da tirosinase calculados para a reação de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.

K_m (μM)	Erro padrão (μM)	V_{max} (μM/s)	Erro padrão (μM/s)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (μM ⁻¹ s ⁻¹)	[E] (μM)
80	16	0,92	0,06	329	4,1	2,8 x 10 ⁻³

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{Máx}$ foram calculados através de uma regressão não linear e a curva com os valores ajustados foi representada em conjunto com os dados experimentais (figura 3.22). A constante catalítica, k_{cat} , indica que 327 moléculas de substrato são convertidas a produto, por molécula de tirosinase por segundo. O erro do ajuste não linear aos valores experimentais foi baixo e, como tal, os valores de erro associados aos parâmetros cinéticos são reduzidos. O valor de erro propagado calculado para o parâmetro de eficiência catalítica foi de 0,003, pelo que o valor calculado para este parâmetro, 4,1 μM⁻¹ s⁻¹, é fiável. O baixo valor de K_m poderá ser indicativo da alta afinidade para o substrato. O valor de K_m determinado no presente estudo (0,08 mM) é comparável ao valor publicado em literatura de 0,1 mM ^[108] tendo os ensaios neste estudo sido realizados a pH 7 (solução de tampão fosfato).

3.2 Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Ouro

Para a formação dos bionanoconjugados foi necessário sintetizar AuNPs. A síntese foi efectuada seguindo o método descrito por *Turkevich et al.* ^[17, 18] utilizando citrato como agente redutor.

A síntese foi efectuada com sucesso tendo sido obtida no final uma solução avermelhada, como pretendido. Seguidamente procedeu-se à caracterização das AuNPs, através do método descrito por *Haiss et al.* ^[100]. Efectuou-se uma diluição 1:5 da solução de AuNP com água mili-Q e obteve-se o espectro de UV/visível dessa solução diluída (figura 3.23). Pode ser observado o espectro característico de AuNPs com cerca de 15 nm de diâmetro, com a banda plasmónica com o máximo característico situado ao comprimento de onda de 520 nm. Para o cálculo da concentração e diâmetro das AuNPs procedeu-se de acordo com a metodologia descrita no Capítulo II – 2.3.6. A concentração foi determinada como sendo 6,5 nM e o correspondente diâmetro de 15 nm. Apesar do diâmetro estar de acordo com o esperado, o valor da concentração é um pouco reduzido, pelo que foram utilizadas, na preparação de alguns BNC, soluções de AuNPs mais concentradas mas de igual diâmetro, gentilmente sintetizadas pela Dr^a Susana Sousa do REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Sempre que estas partículas sejam utilizadas em vez das sintetizadas no nosso laboratório, tal será mencionado ao longo da discussão dos resultados. As partículas sintetizadas no nosso laboratório são também bastantes estáveis, algo que pode ser confirmado pela análise do espectro obtido e ausência de agregação observável a 600 nm.

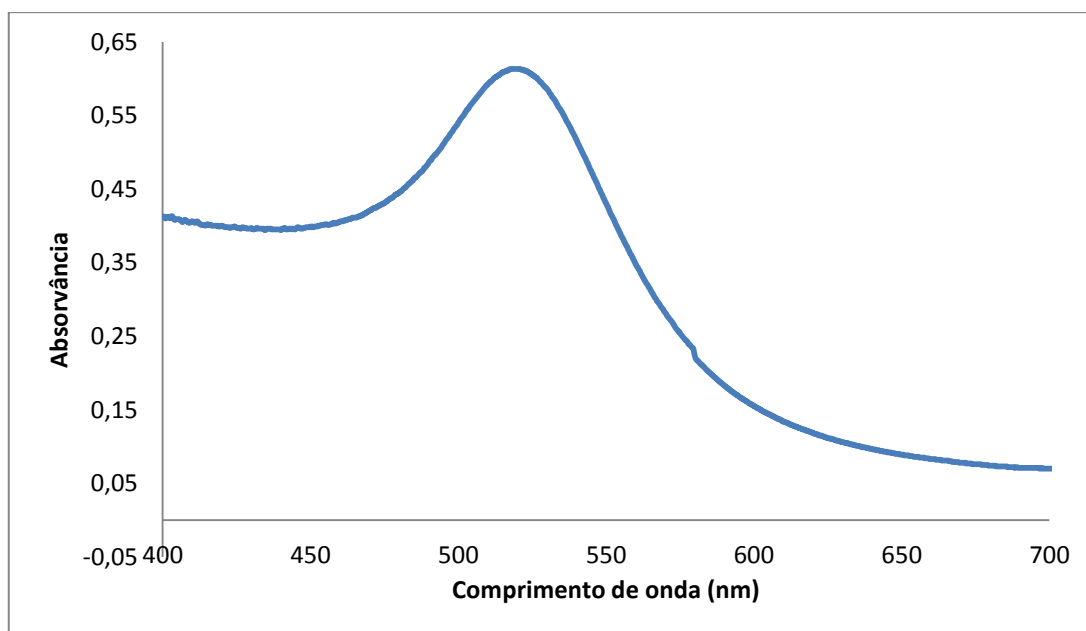


Figura 3.23 - Espectro UV/Vís. da solução de AuNPs sintetizadas pelo método de *Turkevich* com redução por citrato, realizado com diluição 1 : 5, apresentando o máximo de absorção característico a 520 nm.

3.2.2 Funcionalização

Apesar de ser possível obter conjugação direta entre biomoléculas e AuNPs revestidas com citrato (agente redutor e de revestimento), pretendeu-se também estudar a conjugação da tirosinase com AuNPs funcionalizadas com MUA e CALNN. Estes ligandos poderão conferir novas propriedades às AuNPs e maior estabilidade devido à presença de grupos tiol, conferindo-lhes maior afinidade para a superfície de ouro das AuNPs. A maior afinidade para ouro por parte dos grupos tiol, relativamente às moléculas de citrato que revestem a partícula, permite que ocorra a substituição do agente de revestimento, ou seja, que seja feita a funcionalização das AuNPs simplesmente pela adição da solução de MUA ou CALNN à solução de AuNPs, incubando durante a noite. Apesar de citrato conferir estabilidade relativamente prolongada, ligandos como MUA são bastante utilizados na preparação de monocamadas automontadas (SAM) servindo de suporte para a imobilização de biomoléculas, como no caso de biossensores e CALNN, que sendo um pentapéptido, poderá servir para mimetizar as interações entre proteínas facilitando a interação entre AuNP e tirosinase ^[8].

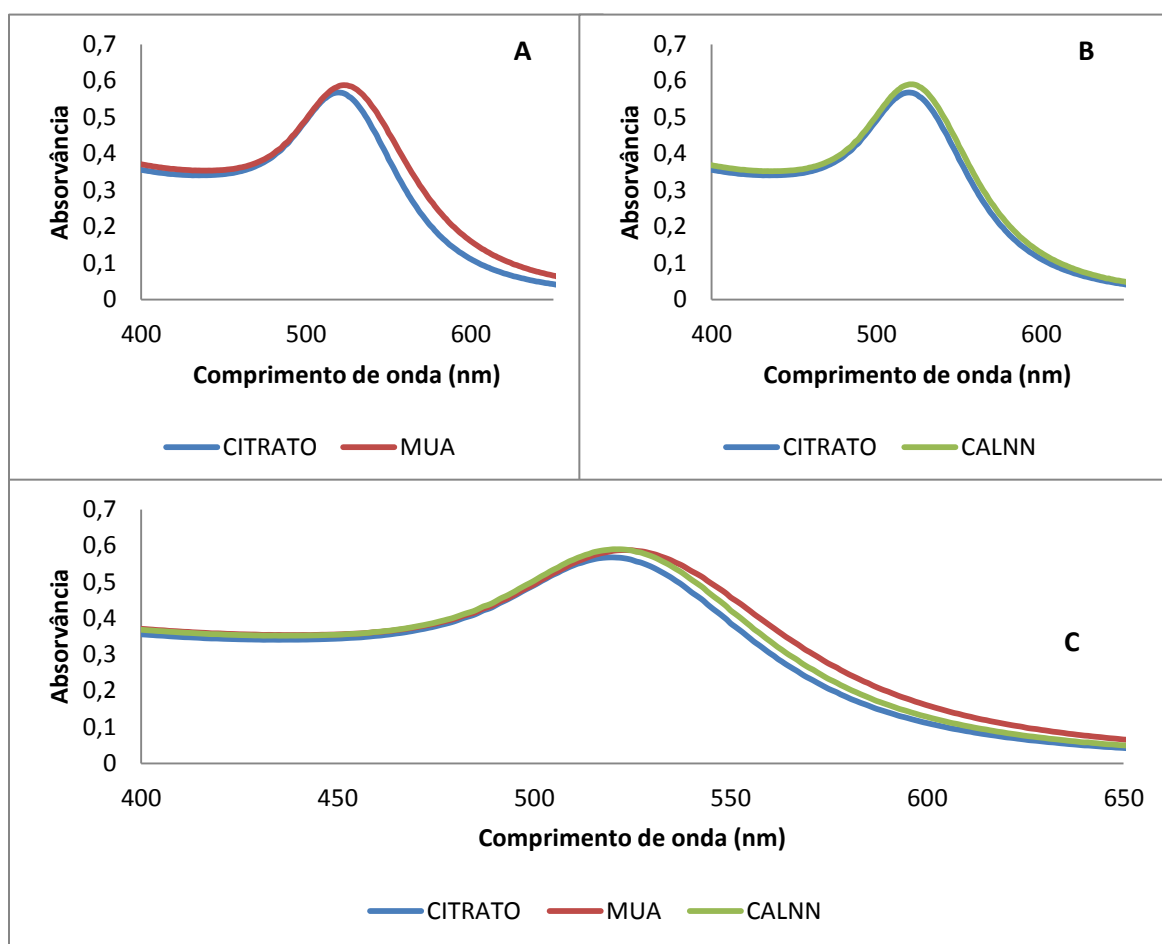


Figura 3.24 – Espectros UV-Vís. das soluções de AuNPs, realizados com diluição 1: 5. A: espectro da solução de AuNPs sintetizadas (a azul) e espectro após a funcionalização com MUA (a vermelho); B: espectro da solução de AuNPs sintetizadas (a azul) e espectro após a funcionalização com CALN (a verde); C: sobreposição dos espectros das diferentes AuNPs onde se observa desvio do máximo de absorção característico após funcionalização.

Na figura 3.24 podem ser observados os espectros obtidos para as funcionalizações com MUA e CALNN, realizando diluições 1:5. Verifica-se que as funcionalizações foram efetuadas com sucesso nos dois casos pois a alteração de agente de revestimento leva a pequenos desvios no comprimento de onda das AuNPs devido à alteração do índice de refração local na sua superfície.

Tabela 3.8 - Comprimento de onda do máximo de absorção característico das diferentes AuNPs

Funcionalização	Comprimento de onda SPR (nm)
Citrato	520
MUA	522
CALNN	523

A funcionalização das AuNPs levou à ocorrência de um desvio do máximo de absorção da banda plasmônica para o vermelho, cerca de 2 nm para a funcionalização com MUA e 3 nm para a funcionalização com CALNN. Este desvio é consistente com o observado por *Lévy et al.* ^[30].

3.3 Bionanoconjugados

3.3.1 Ensaios e determinação de parâmetros cinéticos

O objetivo dos estudos com os BNC é observar o efeito que as diferentes AuNPs funcionalizadas têm sobre a atividade da tirosinase. Para tal pretendeu-se comparar a atividade e parâmetros cinéticos da enzima na sua forma livre em solução e conjugada com as AuNPs.

Aquando da preparação dos BNC observou-se que ocorria agregação das soluções de AuNPs, passando estas de uma cor avermelhada para azul. Como a presença da tirosinase à superfície das AuNPs deveria conferir-lhes uma maior estabilidade, esta agregação não deveria ocorrer. Substituindo o volume de tirosinase a adicionar por apenas solução de tampão fosfato, verificou-se novamente agregação. Foi então preparada uma nova solução tampão diminuindo a concentração de solução de tampão fosfato de 50 mM para 10 mM. Repetindo o processo de adição às AuNPs, desta vez já não ocorreu agregação concluindo-se que esta ocorria devido à força iônica da solução tampão que seria demasiado elevada. Começou-se por estudar BNC preparados com AuNP-cit e foi determinado se seria necessário um passo de lavagem dos conjugados de modo a retirar tirosinase não adsorvida da

solução. Para tal foi efetuada uma centrifugação a 7000 rpm durante 20 minutos e recolhido o sobrenadante e ressuspensa a solução para o seu volume inicial. Realizaram-se, de seguida, ensaios cinéticos com solução de BNC centrifugados e uma segunda reacção com o sobrenadante da mesma. Depois de determinadas as velocidades iniciais das reacções, verificou-se que a atividade observada na solução ressuspensa era muito baixa e na solução do sobrenadante muito semelhante à observada para a reacção com BNC não centrifugados (tabela 3.9). Desta forma foi possível concluir que, devido ao carácter electrostático da interação entre AuNP e tirosinase, muito pouca enzima ficava adsorvida na superfície das AuNP-cit e como tal não seria aconselhável realizar o passo de lavagem dos BNC.

Tabela 3.9 – Valores de velocidade inicial das reacções de oxidação de 4-metilcatecol, efetuando um passo de lavagem do BNC, centrifugando e ressuspensando no mesmo volume de solução inicial. Os ensaios foram realizados com BNC lavado e com o sobrenadante obtido no processo.

Solução	Velocidade inicial (uM/s)
BNC centrifugado e ressuspensão	0,015
Sobrenadante do BNC centrifugado	0,077

Houve, no entanto, dificuldade na determinação das velocidades iniciais das reacções devido às baixas absorvâncias observadas. Como tal, preparou-se uma nova solução de tirosinase, tendo sido determinada a sua concentração em 1,6 mg/mL (apêndice II).

Foram então preparados novos BNC com AuNP-cit e a nova solução de tirosinase para uma concentração final da mesma de 197 nM. A razão molar dos BNC preparados foi 50, tendo sido também preparadas soluções de 4MC com concentrações entre 0,5 e 7 mM. O valor real destas soluções na *cuvette* foi ajustado para propósitos de cálculos dos parâmetros cinéticos. Todas as reacções foram efectuadas nas condições ótimas, determinadas em 3.1.

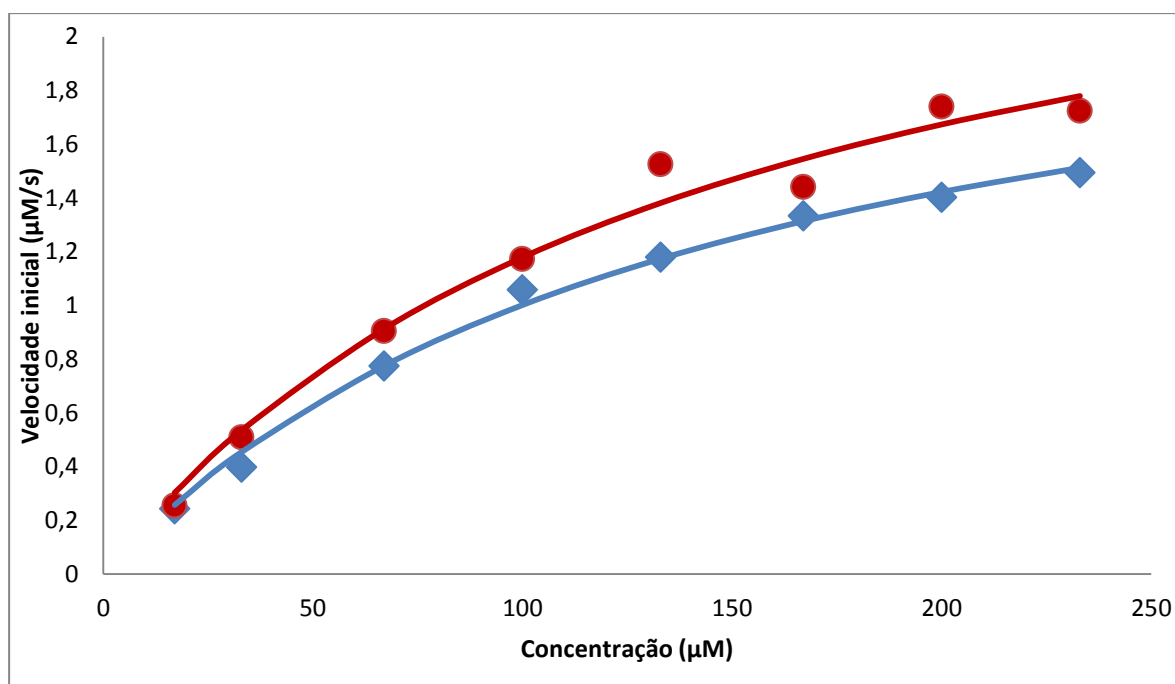


Figura 3.25 – Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta *Solver*. A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 50.

Tabela 3.10 - Parâmetros cinéticos de tirosinase livre e de BNC-Cit (razão molar 50) calculados para a reacção de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.

Solução	K_m (μM)	Erro	V_{max} (μM/s)	Erro	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (μM ⁻¹ s ⁻¹)
Tirosinase livre	145	29	2,5	0,24	13	0,087
BNC-cit	145	25	2,9	0,24	15	0,1

Analisando a figura 3.25, observa-se que a interacção entre AuNP-cit e tirosinase levou ao aumento da atividade da mesma, algo que pode ser confirmado comparando os valores de velocidade inicial, para pontos experimentais com a mesma concentração de substrato. Comparando os valores dos parâmetros cinéticos calculados, observa-se que a tirosinase, tanto na forma livre como conjugada, apresenta a mesma afinidade para o substrato 4MC. No entanto, a forma conjugada apresenta um valor de velocidade máxima de reacção ligeiramente superior (14 %) bem como de eficiência catalítica, cerca de 13 % mais que a sua forma livre em solução. A tirosinase conjugada foi, no entanto capaz de converter apenas mais 2 moléculas de substrato, por molécula de enzima, por segundo que a tirosinase livre. A propagação do erro calculada para o parâmetro k_{cat}/K_m foi de 0,005 nos dois casos, pelo que o

erro não é significativo, podendo-se afirmar que a conjugação da tirosinase com AuNP-cit levou a um aumento de 13 % da sua eficiência catalítica.

Para o ensaio seguinte foram preparados BNC-cit de razão molar 75, mantendo a mesma concentração de enzima utilizada no ensaio anterior mas reduzindo a concentração de AuNPs. Com estas BNC foram realizados os mesmos ensaios de modo a observar se os parâmetros cinéticos eram alterados.

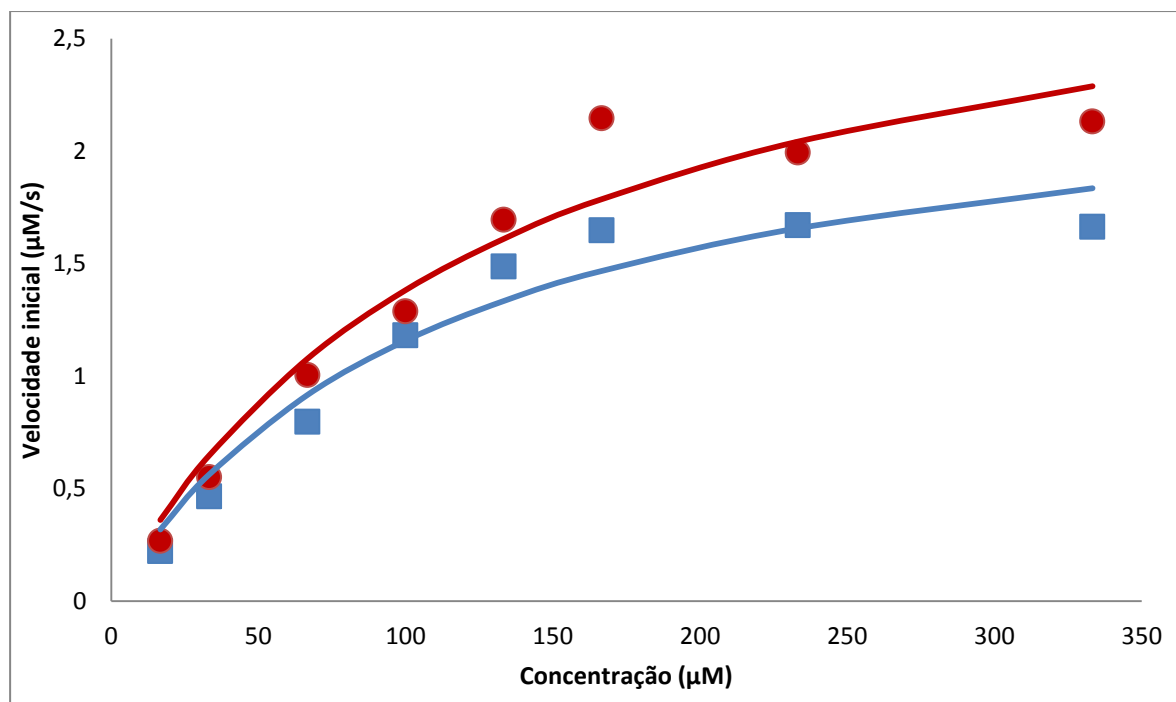


Figura 3.26 - Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função da respectiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta *Solver*. A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 75.

Tabela 3.11 - Parâmetros cinéticos de tirosinase livre e de BNC-Cit (razão molar 75) calculados para a reacção de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.

Solução	K_m (μM)	Erro	V_{max} (μM/s)	Erro	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (μM ⁻¹ s ⁻¹)
		padrão (μM)		padrão (μM/s)		
Tirosinase livre	111	38	2,5	0,35	13	0,12
BNC-cit	130	37	3,2	0,40	16	0,12

Analisando a figura 3.26, verifica-se um aumento de velocidades iniciais de reação semelhante ao observado para o BNC-cit de razão molar 50, relativamente à tirosinase na sua forma livre. Neste estudo verificou-se que a conjugação da tirosinase com AuNP-cit numa razão molar de 75 levou a um aumento de 22 % da velocidade máxima da reação mas com a perda de aproximadamente 15 % de afinidade para 4MC. A eficiência catalítica do BNC foi a mesma que a determinada para a tirosinase na sua forma livre em solução. O erro propagado calculado para este parâmetro foi de 0,01, permitindo concluir que a conjugação não melhorou a eficiência catalítica da tirosinase. Nos ensaios com BNC-cit foram, no entanto, convertidas mais 3 moléculas de substrato, por molécula de enzima por segundo que a tirosinase livre em solução.

Foram também estudados os BNC preparados com AuNP-MUA e AuNP-CALNN, de modo a verificar que efeito a funcionalização destas AuNPs teria na atividade da tirosinase. Para estes ensaios foram utilizadas as partículas fornecidas pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Os BNC foram preparados para uma razão molar de 10 com uma solução de tirosinase de concentração 100 nM, de modo a tentar garantir que o máximo de tirosinase adicionada se encontrava adsorvida à superfície das AuNPs e não livre em solução.

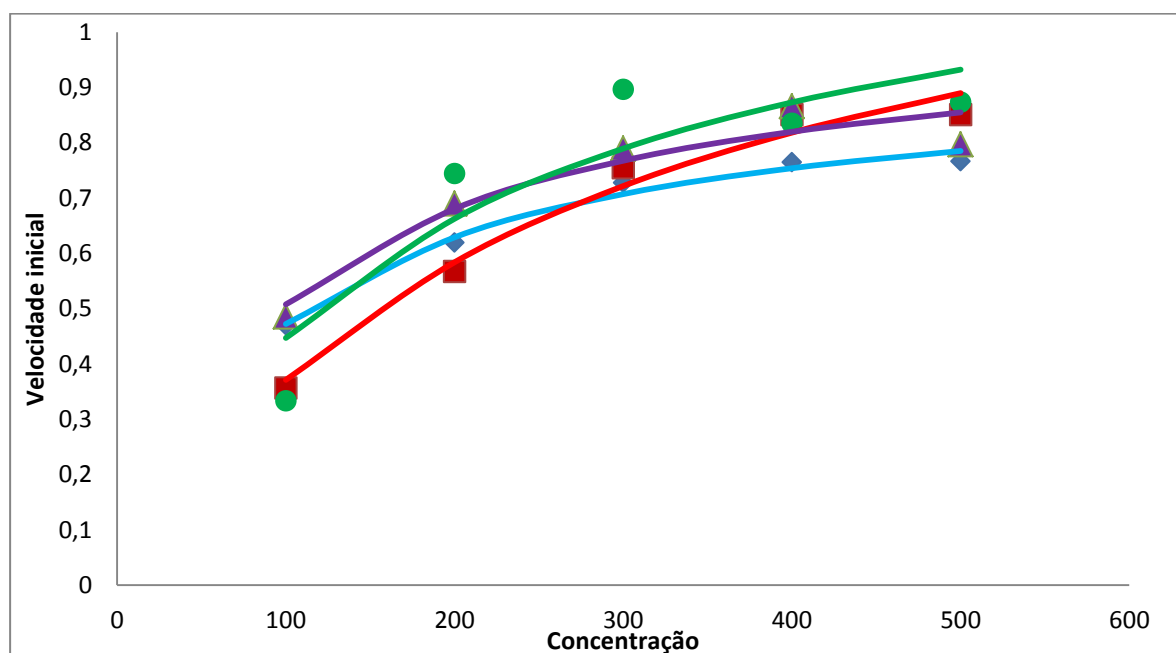


Figura 3.27 - Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta *Solver*. A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 10; a roxo: ensaios com BNC-MUA de razão molar 10; a verde: ensaios com BNC-CALNN de razão molar 10.

Tabela 3.12 - Parâmetros cinéticos de tirosinase livre, BNC-Cit (razão molar 10), BNC-MUA (razão molar 10) e de BNC-CALNN (razão molar 10), calculados para a reação de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.

Solução	K_m (μM)	Erro padrão (μM)	V_{\max} ($\mu\text{M/s}$)	Erro padrão ($\mu\text{M/s}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Tirosinase livre	99	42	0,9	0,1	9	0,09
BNC-Cit	268	106	1,4	0,2	14	0,05
BNC-MUA	103	40	1,0	0,1	10	0,1
BNC-CALNN	186	66	1,3	0,2	13	0,07

De modo a ser possível comparar todos os resultados, todos os ensaios foram realizados no próprio dia, pelo que não foi possível obter mais pontos experimentais, que resultariam em cálculos mais exatos dos parâmetros cinéticos.

Apesar de, pela figura 3.27, ser possível observar valores de velocidade inicial superiores nos BNC em relação aos mesmos para tirosinase livre em solução, os parâmetros cinéticos calculados indicam ter ocorrido perda de afinidade e eficiência catalítica para os BNC, relativamente à enzima livre em solução. A exceção é BNC-MUA que apresentou maior eficiência catalítica de entre todas as soluções utilizadas, apesar de pouco significativa, sendo de aproximadamente 7% o aumento em relação à enzima livre. No entanto, devido aos valores de erro dos parâmetros K_m e V_{\max} serem bastante consideráveis, com a exceção de BNC-CALNN, não é possível então afirmar com confiança que tenha ocorrido perda de afinidade ou, no caso de BNC-MUA, aumento de eficiência catalítica. De modo a reduzir o erro destes parâmetros, teriam sido necessários mais pontos experimentais, permitindo um ajuste não linear mais fiável e consequentemente valores de K_m , V_{\max} e k_{cat}/K_m com menor erro associado.

O estudo seguinte foi efectuado preparando BNCs com razão molar de 120 e utilizando uma concentração de tirosinase de 120 nM.

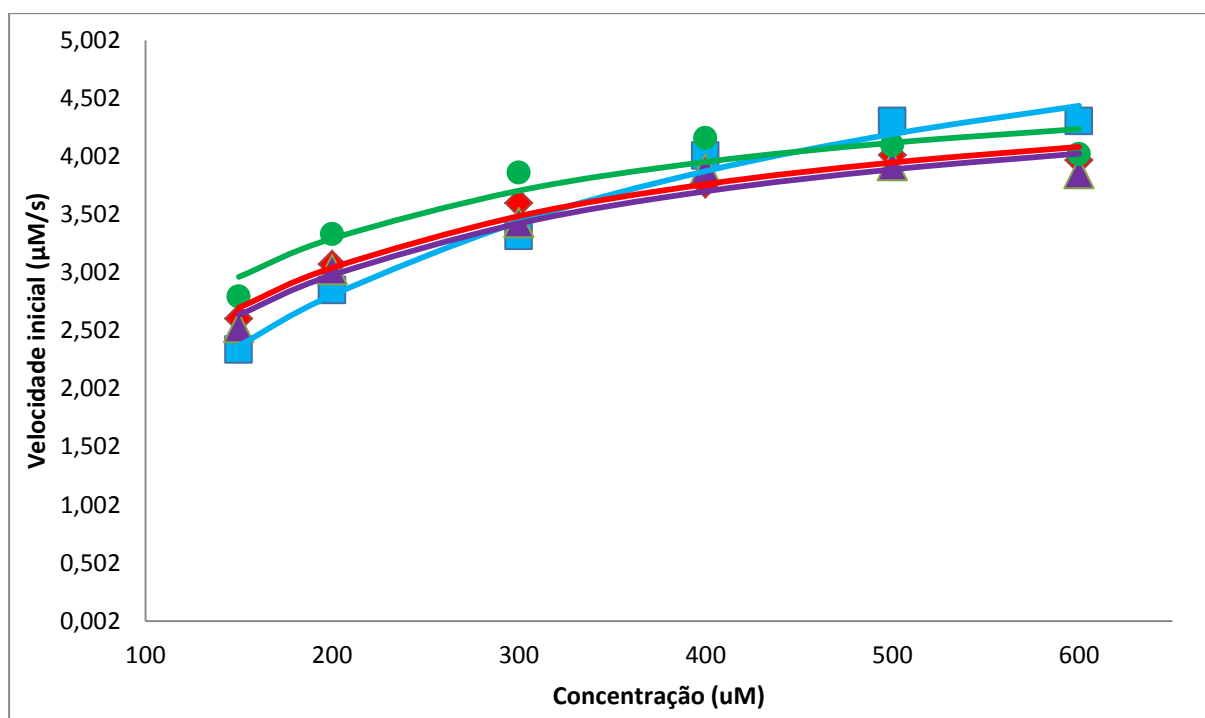


Figura 3.28 - Representação dos valores de velocidade inicial das reacções de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta *Solver*. A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 120; a roxo: ensaios com BNC-MUA de razão molar 120; a verde: ensaios com BNC-CALNN de razão molar 120.

Tabela 3.13 - Parâmetros cinéticos de tirosinase livre, BNC-Cit (razão molar 120), BNC-MUA (razão molar 120) e de BNC-CALNN (razão molar 120), calculados para a reacção de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.

Solução	K_m (μM)	Erro		Erro		k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)
		padrão (μM)	V_{max} (μM/s)	padrão (μM/s)	k_{cat} (s^{-1})	
Tirosinase livre	246	39	6,3	0,4	53	0,21
BNC-Cit	124	23	4,9	0,3	40	0,32
BNC-MUA	128	24	4,9	0,3	40	0,31
BNC-CALNN	100	19	4,9	0,2	40	0,4

Para estes ensaios cinéticos, não foi possível determinar velocidades iniciais a concentrações de substrato mais baixas devido a instabilidade do produto formado, originando uma curva atípica. Na tabela 3.13 encontram-se os parâmetros cinéticos calculados para BNC de razão molar 120, podendo-

se observar que apesar da tirosinase livre apresentar maior valor de velocidade máxima de reação, a sua afinidade para o substrato foi menor que a verificada para os BNCs. De entre estes, BNC-CALNN apresentou os melhores resultados pois o seu respetivo valor de K_m é o menor, logo a sua afinidade para o substrato maior e a sua eficiência catalítica é quase o dobro da calculada para a tirosinase livre. O erro associado aos parâmetros K_m e V_{max} é aceitável, sendo bastante reduzido. O erro propagado calculado para o parâmetro da eficiência catalítica foi de 0,006; 0,01; 0,01 e 0,02 para tirosinase livre, BNC-Cit, BNC-MUA e BNC-CALNN, respectivamente. Estes valores de erro são baixos e aceitáveis. A percentagem de aumento da eficiência catalítica relativa à tirosinase livre encontra-se ilustrada na figura 3.29, de onde se pode concluir que todos os BNC apresentaram valores superiores e BNC-CALNN apresenta o melhor resultado de entre todos com cerca de 48 % de aumento de eficiência catalítica relativamente à tirosinase na sua forma livre em solução.

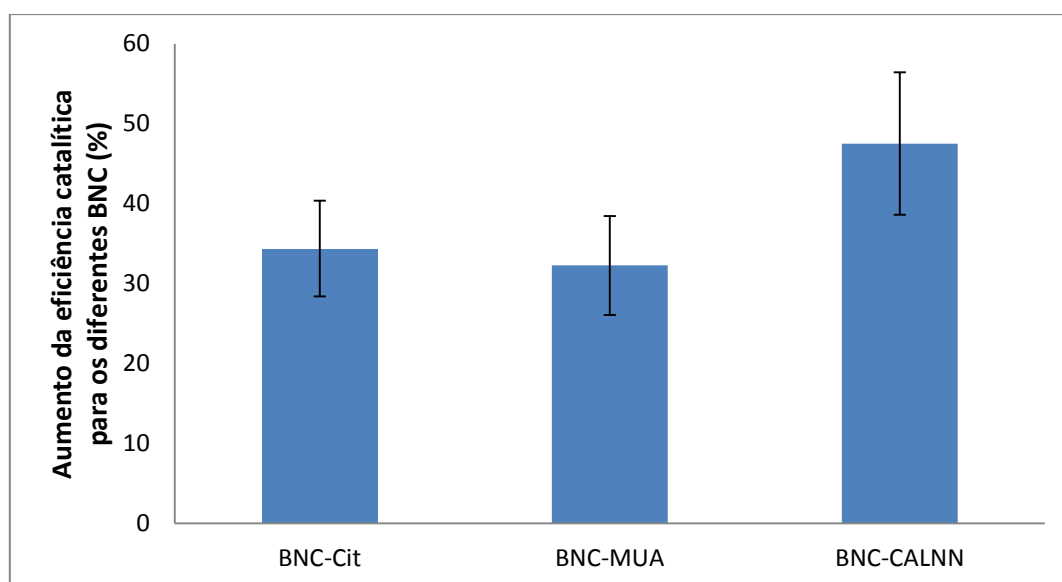


Figura 3.29 – Representação do aumento de eficiência catalítica determinada nos BNCs de razão molar 120 comparativamente com tirosinase livre em solução.

Foi realizado um ensaio com BNCs de razão molar 350. Esta razão é mais elevada que as estudadas anteriormente e teve como objetivo verificar o efeito que uma concentração bastante mais elevada de tirosinase à superfície das AuNPs teria na atividade e nos parâmetros cinéticos da enzima. A concentração de tirosinase utilizada foi de 5600 nM e a concentração de AuNPs de 16 nM. As soluções de 4MC utilizadas nos ensaios tiveram uma concentração na gama de 50 a 2000 μ M.

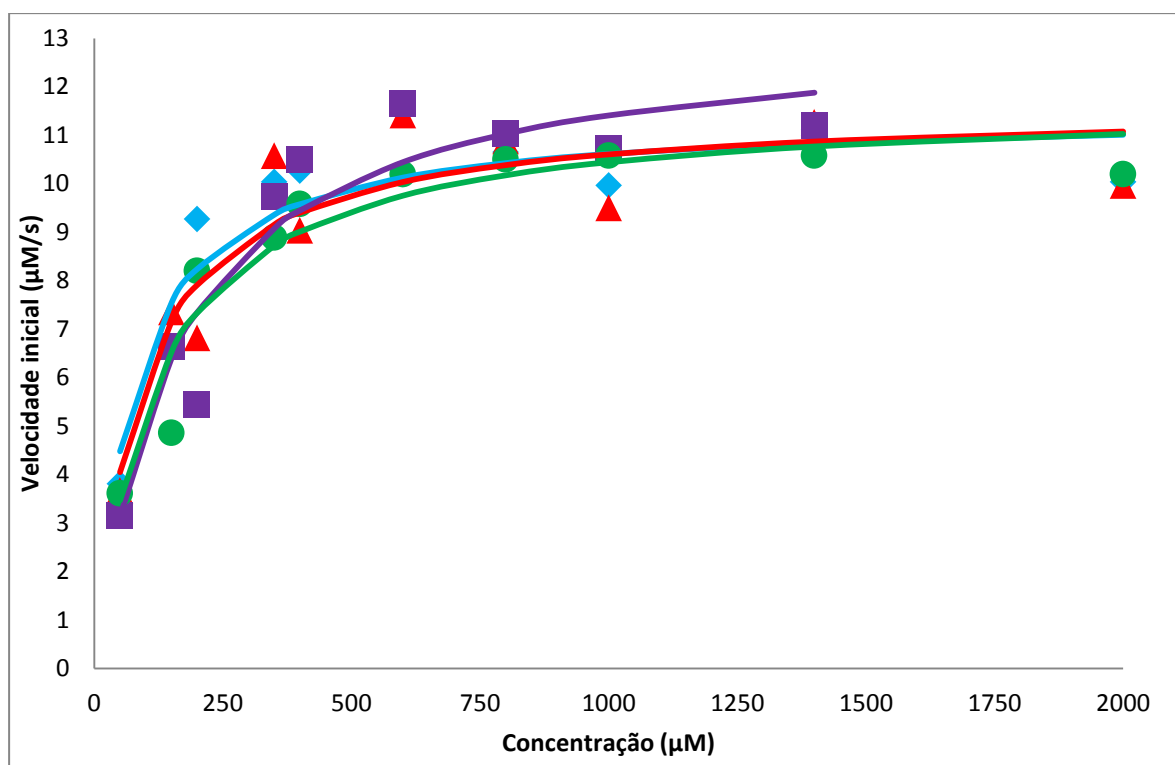


Figura 3.30 – Representação dos valores de velocidade inicial das reações de oxidação de 4-metilcatecol em função da respetiva concentração de substrato. Os pontos representam os valores experimentais obtidos e as linhas contínuas representam o ajuste não linear dos valores experimentais obtido recorrendo à ferramenta *Solver*. A azul: ensaios com tirosinase livre; a vermelho: ensaios com BNC-Cit de razão molar 350; a roxo: ensaios com BNC-MUA de razão molar 350; a verde: ensaios com BNC-CALNN de razão molar 350.

Tabela 3.14 - Parâmetros cinéticos de tirosinase livre, BNC-Cit (razão molar 350), BNC-MUA (razão molar 350) e de BNC-CALNN (razão molar 350), calculados para a reação de oxidação de 4-metilcatecol, a 30 °C pH 6,5.

Solução	K_m (μM)	Erro	V_{max} ($\mu M/s$)	Erro	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} s^{-1}$)
		padrão (μM)		padrão ($\mu M/s$)		
Tirosinase livre	77	21	11	0,6	2,0	0,03
BNC-Cit	93	24	12	0,6	2,1	0,02
BNC-MUA	161	40	13	0,9	2,3	0,01
BNC-CALNN	118	30	12	0,6	2,1	0,02

Pela análise da tabela 3.14 verifica-se que apesar de pouco significativo, houve um aumento da velocidade máxima de reação para todos os BNC relativamente à enzima na sua forma livre, sendo que o erro associado a este parâmetro bastante reduzido. Apesar de apresentar um valor de erro

associado mais significativo, os diferentes BNCs apresentaram valores de K_m mais elevados comparativamente ao valor de K_m da tirosinase livre, o que representa menor afinidade para o substrato após conjugação com AuNPs. A constante k_{cat} é aproximadamente igual para as quatro soluções estudadas, tendo-se verificado o mesmo para o valor do parâmetro da eficiência catalítica, apesar do valor deste parâmetro ser maior para a tirosinase livre em solução. No entanto, o valor do erro propagado calculado para o parâmetro de eficiência catalítica para tirosinase livre, BNC-Cit, BNC-MUA e BNC-CALNN foi de 0,05; 0,04; 0,03 e 0,03 respetivamente. Este valor é bastante elevado e não permite a análise dos valores de eficiência catalítica com fiabilidade.

Na figura 3.30 pode ser observada uma grande dispersão de pontos experimentais, nos diferentes ensaios realizados, com a exceção de BNC-CALNN. A dispersão observada, que terá levado ao maior erro no ajuste não linear e consequentemente parâmetros cinéticos, poderá estar relacionada com a elevada concentração de tirosinase adsorvida na superfície das AuNPs. A saturação desta mesma superfície poderá ter levado à ocorrência de interações entre moléculas de enzima, bem como a formação de multicamadas proteicas, que podem limitar a difusão do substrato e da libertação do produto reacional, podendo também ocorrer inactivação da enzima ^[38]. A formação de multicamadas poderá deste modo explicar o valor considerável do erro associado aos parâmetros K_m e k_{cat}/K_m . O valor do erro associado aos parâmetros da tirosinase livre é, no entanto, também bastante alto. Neste caso a formação de multicamadas não deverá ocorrer, pois a enzima não se encontra imobilizada. O valor do erro poderá então estar relacionado com a instabilidade do produto reacional, sendo que talvez ocorram reações entre quinonas, algo que adulteraria os valores dos parâmetros calculados pois a medição da absorvância a 400 nm não seria correcta.

3.3.2 Comparação entre velocidades iniciais das reações

Numa tentativa de simplificação do estudo de BNC, foi averiguada apenas a velocidade inicial das reações, tentando desta forma comparar a existência ou não de aumento de atividade da tirosinase provocado pela interacção com AuNPs. Utilizando a mesma concentração de enzima em todas as soluções usadas nos mesmos ensaios e variando a razão molar dos BNC preparados, são realizadas reacções enzimáticas mantendo a concentração de substrato constante em todos. A concentração de substrato no ensaio foi uma que permitisse a determinação de velocidade inicial sem instabilidade do produto formado e garantindo que a absorvância medida não era demasiado baixa. Pela análise da figura 3.31, observa-se que, com a exceção de BNC-Cit e BNC-CALNN (razão 30), BNC-Cit (razão 100) e BNC-CALNN (razão 250), não se verifica aumento de atividade dos BNC em relação à tirosinase na sua forma livre. No entanto, verificou-se atrás em 3.3.1 que para uma razão molar de 120 os valores de velocidade inicial eram superiores para os BNC, não se verificando o mesmo neste caso.

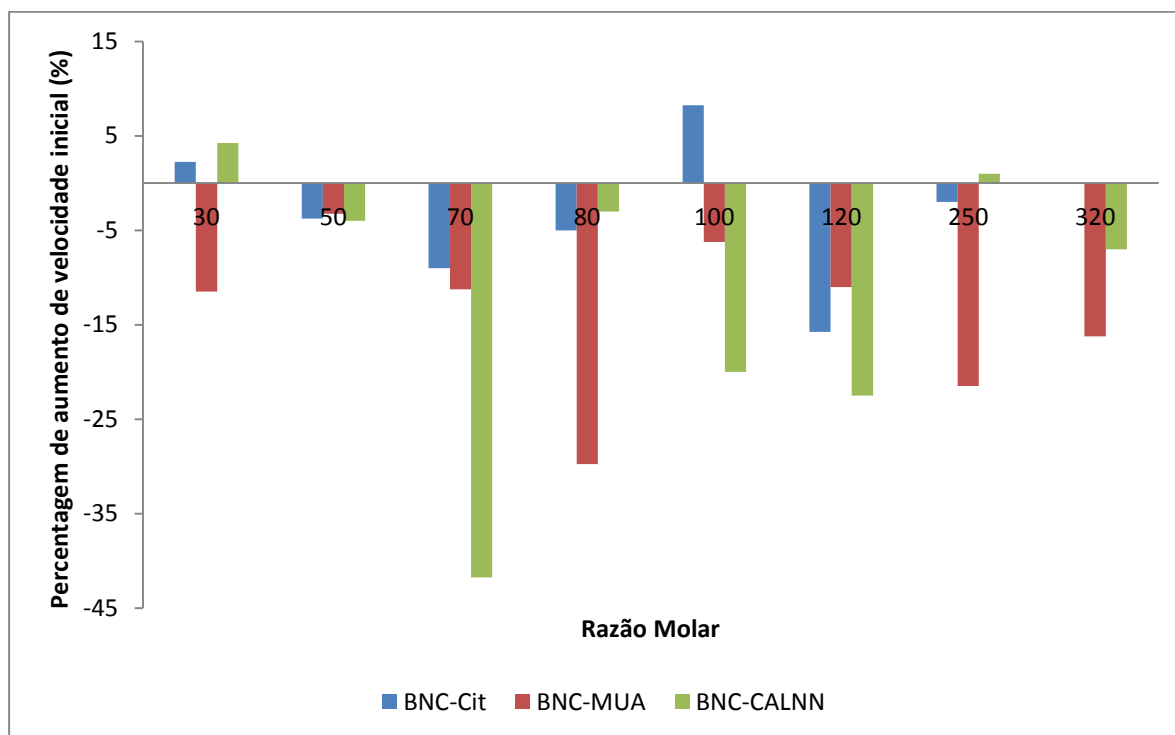


Figura 3.31 – Representação da percentagem de aumento de velocidade inicial da reacção de oxidação de 200 μ M de 4-metilcatecol observado para os BNCs de diferentes razões molares, relativamente velocidade inicial de reacção determinada para a tirosinase livre em solução. A concentração de tirosinase foi igual em todos os ensaios (320 nM).

Uma repetição do ensaio, com novos BNCs de razão molar 120 (figura 3.32), mostrou ocorrer aumento da velocidade inicial nos ensaios com BNC, algo que não se verificou na figura 3.31. Verifica-se também que o maior aumento de velocidade inicial, que no ensaio da figura 3.29 correspondia a BNC-CALNN, é neste caso observado para BNC-MUA.

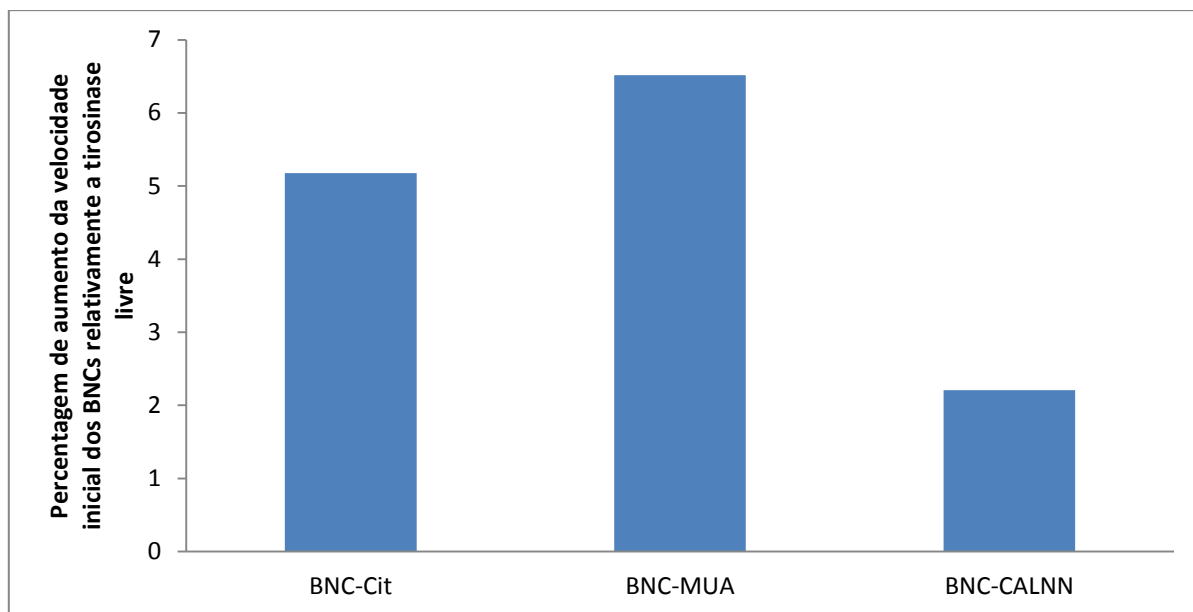


Figura 3.32 - Representação da percentagem de aumento de velocidade inicial da reacção de oxidação de 200 μ M de 4-metilcatecol observado para os BNCs de razão molar 120, relativamente velocidade inicial de reacção determinada para a tirosinase livre em solução.

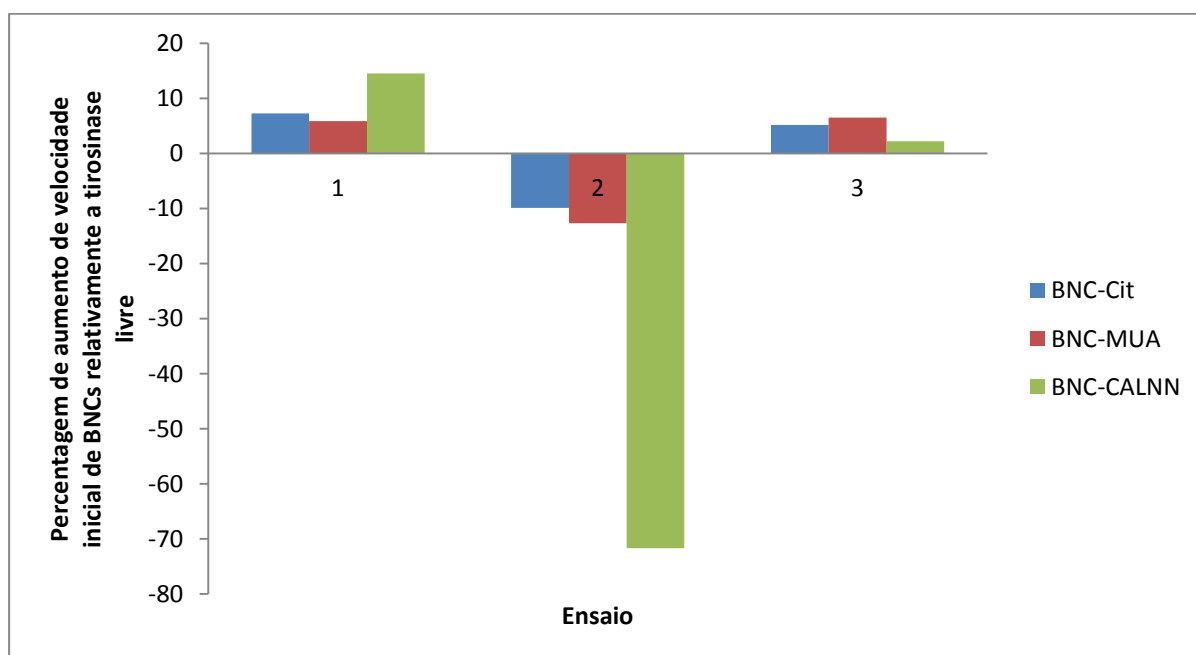


Figura 3.33 - Representação da percentagem de aumento de velocidade inicial da reacção de oxidação de 200 μ M de 4-metilcatecol observado para os diferentes BNCs de razão molar 120, relativamente velocidade inicial de reacção determinada para a tirosinase livre em solução. Concentração de tirosinase no ensaio 1 - 120 nM; ensaio 2 – 320 nM; ensaio 3 – 167 nM.

Na figura 3.33 encontram-se os três diferentes ensaios para razões molares de 120. Estes três foram realizados à mesma concentração de substrato, 200 μ M, variando a concentração de tirosinase e AuNPs em cada. Pela análise da figura é possível observar que em ambos os ensaios em que se

verifica aumento de atividade da tirosinase, ensaio 1 e 3, a concentração utilizada de enzima é bastante semelhante. No ensaio 2, em que se observa perda de atividade, a concentração é bastante superior sendo cerca de duas vezes superior à da concentração utilizada no ensaio 3. Apesar de, como referido, a razão molar ser a mesma em todos os ensaios, esta observação de aumento de atividade poderá indicar que existe uma concentração, ou gama de concentrações, de tirosinase e AuNPs mais indicada para a preparação de BNCs.

Nestes ensaios foi então difícil concluir algo acerca do efeito que a conjugação, entre a tirosinase e as diferentes AuNPs funcionalizadas, teria na atividade da enzima devido à irregularidade dos resultados obtidos nos mesmos. Outra das dificuldades do estudo foi a impossibilidade da determinação da velocidade inicial das reações a concentrações baixas de substrato. Uma alternativa para estudos futuros poderá passar pela determinação da atividade da tirosinase seguindo a oxidação de ácido ascórbico que poderá permitir a determinação das velocidades iniciais indiretamente pela redução do produto formado da reacção, evitando a instabilidade do mesmo e as alterações observadas nas absorvâncias a 400 nm.

3.3.3 Simulação computacional da Tirosinase a pH 6,5

Através do programa *UCSF Chimera* 1.8rc ^[77] procedeu-se à modelação da molécula de tirosinase (PDB 2y9w ^[59]) de modo a tentar perceber como poderia esta interagir com as AuNPs. Para tal, utilizando a ferramenta *PDB2PQR* ^[109,110] do mesmo programa, foi possível simular o estados de protonação da tirosinase a pH 6,5, o pH utilizado nos ensaios. No final da simulação é gerado um ficheiro *PQR*, que é importado novamente para o programa *Chimera*. De seguida é utilizada a ferramenta *APBS* ^[111] que procede aos cálculos electrostáticos resultando num mapa de potencial electrostático e é colorida a superfície da tirosinase, de acordo com potencial negativo (vermelho), neutro (branco) ou positivo (azul). Foi também colorida a superfície de acordo com o potencial electrostático obtido pela lei de *Coulomb* através da ferramenta *Coulombic Surface Coloring*, cujas imagens obtidas foram mais elucidativas. Ambas as ferramentas são semelhantes, sendo que *APBS* requer a computação de uma grelha de potencial electrostático previamente obtido, por ligação do programa a um serviço *web*. As imagens obtidas por *APBS* encontram-se em anexo (apêndice III) sendo apresentadas as imagens obtidas pela ferramenta *Coulombic Surface Coloring*.

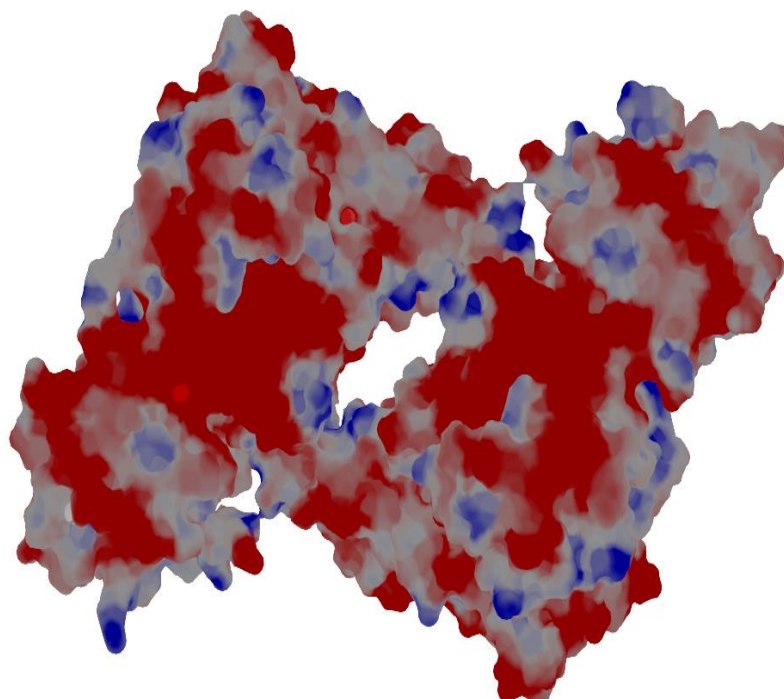


Figura 3.34 - Imagem frontal da estrutura tridimensional da enzima tirosinase de *Agaricus bisporus*, com base na estrutura cristalográfica depositada com o código PDB 2y9w. A imagem foi preparada utilizando o *software Chimera* ^[77].

É assumido como sendo imagem frontal, a imagem obtida ao abrir o ficheiro *PDB* no programa. Pela análise da figura 3.34 é possível observar que o potencial electrostático da tirosinase a pH 6,5 é maioritariamente negativo. Como o ponto isoeléctrico da tirosinase se encontra entre 4,1 - 4,5 o potencial electrostático simulado está de acordo com o esperado para este valor de pH. Observando a molécula de outro perfil (figura 3.35) é possível observar a existência de menor potencial electrostático negativo e a existência de duas regiões, indicadas com uma seta na figura, que poderão ser responsáveis pela conjugação com as AuNPs. Esta região corresponde à subunidade L da tirosinase. Existe também uma região central, indicada na figura com um círculo, que poderá também interagir com as AuNPs devido à presença de resíduos neutros e positivos, algo que não se verifica na imagem frontal da enzima. Esta região compreende as subunidades H, que contém o centro ativo da enzima. A possível interação da tirosinase com AuNPs nesta região poderá explicar a irregularidade de resultados observados pois poderia dificultar o acesso do substrato ao centro ativo, algo que não se verificaria caso a interação ocorra na zona da subunidade L.

A interação por adsorção electrostática deverá ocorrer pela zona da subunidade L, visto ser a zona que apresenta carga superficial maioritariamente positiva ou neutra. No entanto, como a imobilização por adsorção tende a ocorrer na zona onde existe um maior número de contactos entre a superfície e a enzima ^[112] o que poderá levar a que a adsorção ocorra na região indicada na figura 3.35 com círculo, que engloba zonas da subunidade, podendo dificultar o acesso do substrato ao centro ativo ou da consequente libertação do produto reacional.

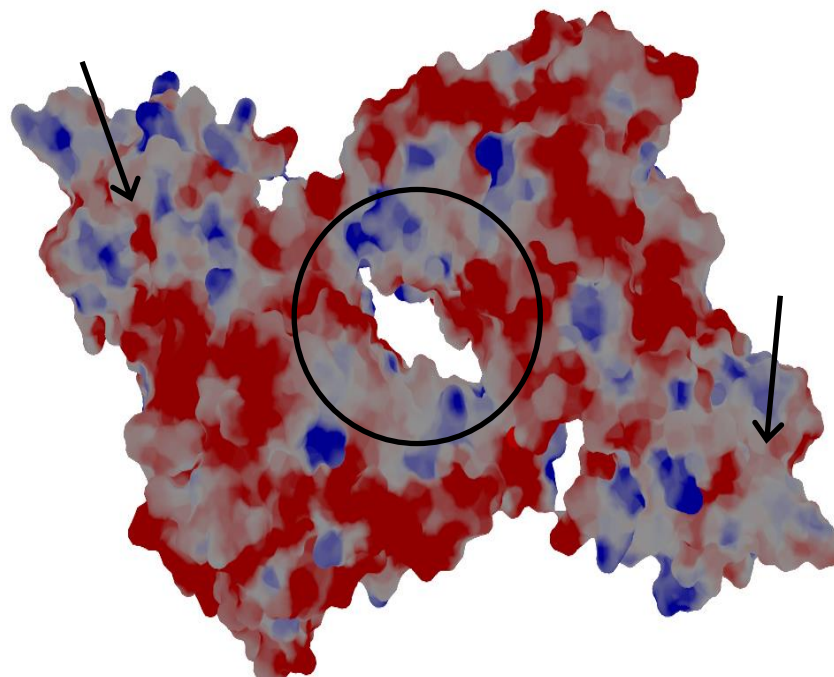
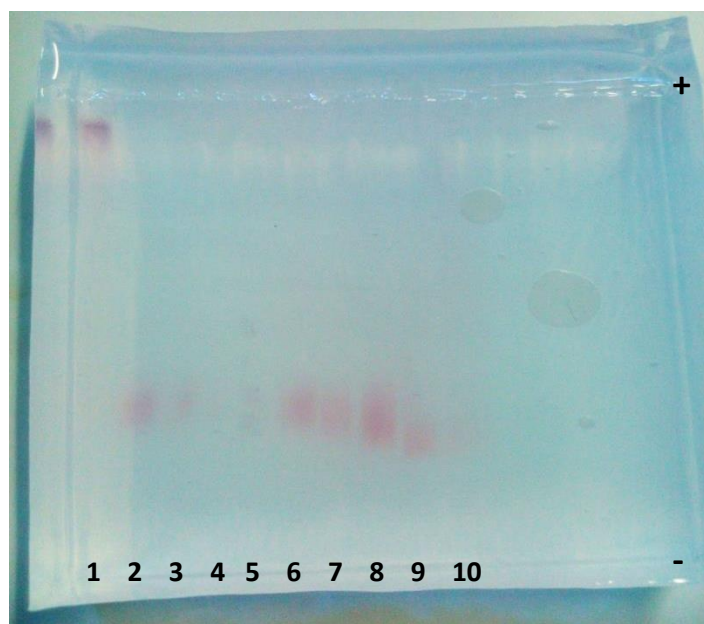


Figura 3.35 - Imagem da estrutura tridimensional da enzima tirosinase de *Agaricus bisporus* vista por trás, com base na estrutura cristalográfica depositada com o código PDB 2y9w. A imagem foi preparada utilizando o *software Chimera* ^[77]. Encontra-se representada por setas, a região da subunidade L pela qual pode ocorrer adsorção à superfície das AuNPs. Representada por um círculo encontra-se a região, que engloba zonas da subunidade H, pela qual poderá ocorrer também adsorção à superfície das AuNPs.

3.3.4 Electroforese em gel de agarose

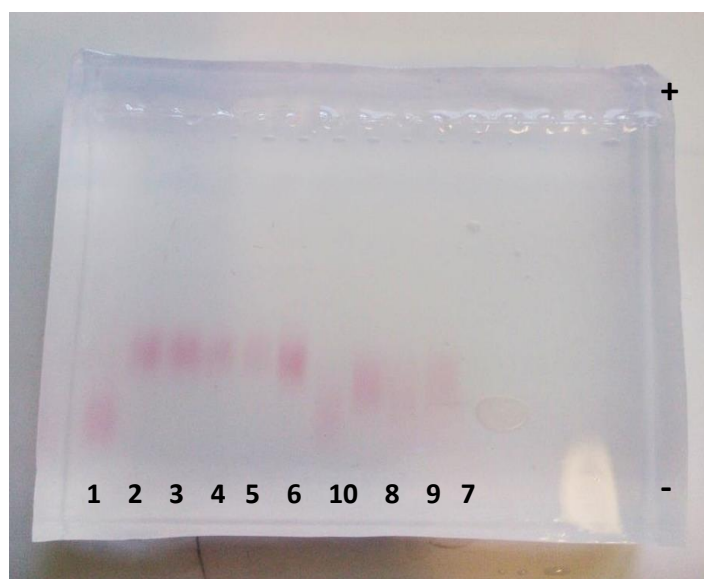
Pretendia-se com realização de electroforeses determinar qual a razão à qual a tirosinase cobriria totalmente as AuNPs. A cobertura óptima das AuNPs garantiria maior influência da interação das mesmas sobre a tirosinase mas uma saturação da superfície poderá levar à formação de multicamadas proteicas e como tal será necessário evitar valores acima e próximos de razões, nas quais se verifique menor migração no gel. As AuNPs ao possuírem carga negativa migrarão para o ânodo. Assim que a sua superfície comece a ser coberta pela enzima, as AuNPs migrarão menos no gel permitindo determinar a razão a partir da qual se a migração é menor e se encontram totalmente cobertas de tirosinase. Para tal foram preparados BNCs a diferentes razões molares, utilizando as

AuNPs sintetizadas e funcionalizadas no laboratório de concentração 6,5 nM, fixando a concentração das mesmas e variando a concentração de tirosinase.



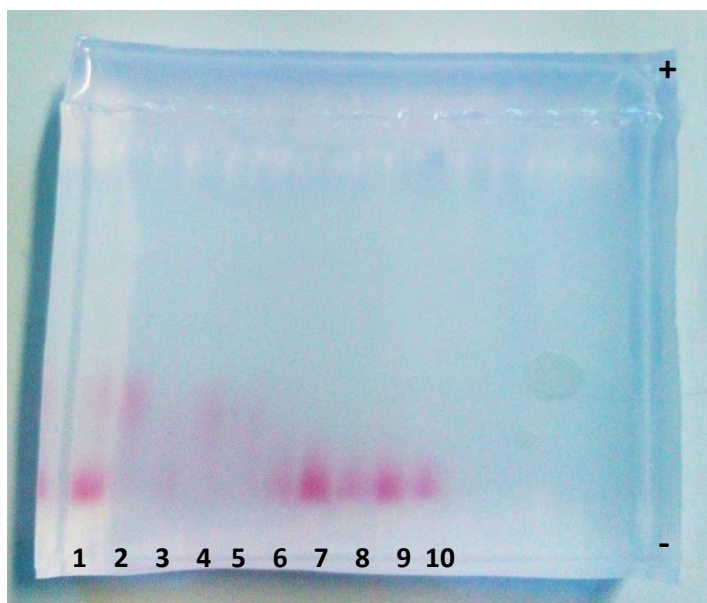
Poço	Razão molar
1	0
2	3975
3	3180
4	2385
5	1600
6	800
7	400
8	200
9	55
10	30

Figura 3.36 – Electroforese em gel de agarose para BNC-Cit; a tabela na direita mostra a razão molar, entre tirosinase e AuNP-Cit, dos BNC depositados em cada poço.



Poço	Razão molar
1	0
2	3975
3	3180
4	2385
5	1600
6	800
7	400
8	200
9	55
10	30

Figura 3.37 – Electroforese em gel de agarose para BNC-CALNN; a tabela na direita mostra a razão molar, entre tirosinase e AuNP-CALNN, dos BNC depositados em cada poço.



Poço	Razão molar
1	0
2	3975
3	3180
4	2385
5	1600
6	800
7	400
8	200
9	55
10	30

Figura 3.38 - Electroforese em gel de agarose para BNC-MUA; a tabela na direita mostra a razão molar, entre tirosinase e AuNP-MUA, dos BNC depositados em cada poço.

Na figura 3.36 pode ser observado que começa a verificar-se menos migração por parte das AuNPs no poço 7, que corresponde à razão de 400. O mesmo pode ser observado na figura 3.37. Nesta electroforese foi introduzida por lapso a amostra de razão 30 no poço 7. Na electroforese com BNC-MUA (figura 3.38) observou-se menor migração a partir do poço 6, que corresponde à razão molar de 800.

Com estes resultados conclui-se que será interessante em estudos futuros, realizar os mesmos começando por preparar BNCs de razão molar abaixo de 400, evitando a saturação da superfície das AuNPs e formação de multicamadas proteicas. O facto de ser necessária metade da concentração de tirosinase para recobrir a superfície de AuNPs funcionalizadas com citrato e CALNN, relativamente às funcionalizadas com MUA, indica também que os estudos futuros poderão começar com estes dois tipos de AuNPs.

Capítulo IV: Conclusões

4.1 Conclusões

Determinando a actividade específica da tirosinase com três diferentes substratos fenólicos, foi possível concluir qual o substrato mais adequado para o prosseguimento do trabalho experimental. Nos ensaios com tirosina observou-se um período de latência antes do início da formação de produto, algo que não ocorreu para os substratos difenólicos, L-DOPA e 4MC. A atividade específica da tirosinase com tirosina foi também menor que a determinada para os outros dois substratos. Os ensaios com 4MC apresentaram maior atividade específica da tirosinase, sendo que foi necessária menor concentração de enzima para a realização dos mesmos. Deste modo, 4MC foi selecionado como o substrato a utilizar no decorrer do trabalho experimental, apresentando também as vantagens de permitir um menor gasto de enzima e de substrato, para a realização do mesmo.

Previamente ao início dos ensaios cinéticos foi efetuada, com sucesso, a otimização de parâmetros reacionais como pH e temperatura. Variando a temperatura das reações, verificou-se que a atividade da tirosinase era mais elevada 30 °C. Ensaios análogos, variando o pH da mistura reacional, permitiram determinar o pH ótimo de atividade da tirosinase como sendo 6,5. A saturação da mistura reacional com oxigénio não melhorou significativamente a atividade da tirosinase, ao contrário do verificado quando tirosina foi utilizada como substrato. Deste modo, concluiu-se que não seria necessário este passo adicional para a realização dos ensaios. Na preparação das soluções de 4MC, observou-se que este substrato é propenso a auto oxidação rápida, algo que ocorre com maior rapidez para valores de pH mais alcalinos. Concluiu-se que as soluções de 4MC têm de ser preparadas antes do início dos ensaios. Estas devem também ser mantidas a temperaturas mais baixas e protegidas de fontes de luz, de modo a retardar este efeito e garantir a integridade dos resultados obtidos.

A síntese de AuNPs, seguindo o método de *Turkevich*, originou soluções coloidais estáveis de partículas com 15 nm de diâmetro. A funcionalização das mesmas com MUA e CALNN foi efetuada com sucesso. Ao observar-se agregação de AuNPs aquando da preparação dos BNC, concluiu-se que a força iónica da solução deve ser o mais baixo possível, de modo a evitar este fenómeno ocorra. BNCs preparados com solução de tampão fosfato, com concentração 10 mM, permitiram que a conjugação ocorresse sem que se observasse agregação.

A difícil reprodutibilidade dos resultados obtidos para ensaios com BNCs e a instabilidade do produto reaccional, dificultaram a análise do efeito que as AuNPs teriam na atividade enzimática da tirosinase. A partir dos resultados da análise de velocidades iniciais, determinadas para diferentes razões molares de BNCs, conclui-se que, devido aos valores erráticos observados, a comparação de velocidades iniciais não será o melhor método para avaliar a melhoria, ou não, da atividade enzimática. Estes valores erráticos poderão, no entanto, dever-se à instabilidade da o-quinona

produzida na reação de oxidação pelo que seria necessário a repetição dos mesmos ensaios mas utilizando diferentes métodos para a determinação da velocidade inicial, como por exemplo a determinação indireta do produto seguindo a oxidação de ácido ascórbico. A comparação entre resultados de diferentes metodologias permitiria concluir com maior certeza se a comparação de velocidades iniciais é um bom método para avaliar o efeito que as AuNPs têm sobre a atividade enzimática da tirosinase.

A determinação dos parâmetros cinéticos como K_m e k_{cat}/K_m permitiu uma melhor comparação entre a atividade enzimática da tirosinase livre em solução e adsorvida nas diferentes AuNPs. Os resultados mais promissores foram obtidos com BNC de razão molar 120, em que foi possível verificar diminuição do valor de K_m , ou seja, aumento da afinidade para o substrato e aumento do valor de k_{cat}/K_m , ou seja, aumento da eficiência catalítica relativamente à enzima na sua forma livre em solução. De entre todos os BNC estudados, BNC-CALNN apresentou os melhores resultados de K_m e k_{cat}/K_m , sendo o aumento deste último parâmetro cerca de 48%. Em ensaios com BNC com razão molar reduzida (10) ou elevada (350) não houve melhoria da atividade enzimática, tendo ocorrido diminuição da afinidade para o substrato e de eficiência catalítica. A razão molar elevada poderá levar à formação de uma multicamada proteica que dificultará a difusão do substrato para as camadas mais interiores. A razão molar reduzida poderá favorecer a adsorção da tirosinase na superfície das AuNPs de diferente forma, que dificulte o acesso do substrato ao centro ativo, visto a sua concentração ser menor e ocorrer menor ocupação da superfície por parte de outras moléculas de tirosinase.

Nos ensaios cinéticos com BNC de razão 50 e 75, estes apenas efetuados com BNC-Cit, foi possível verificar que apesar de não se observar aumento de afinidade ou de eficiência catalítica, houve um aumento do valor de V_{max} , em ambos os casos, relativamente à velocidade máxima de reação para a tirosinase livre. Estes últimos resultados permitem concluir que apesar de não ter ocorrido melhoria da atividade enzimática, esta foi mantida aquando da conjugação da tirosinase com AuNPs-Cit e melhorando parâmetros como V_{max} e k_{cat} , algo que pode ser interessante para aplicações biotecnológicas devido aos benefícios que imobilização enzimática apresenta, já mencionados no capítulo I.

Os três ensaios com BNCs de razão molar 120 parecem evidenciar a existência de uma relação entre a concentração de tirosinase e de AuNPs com o aumento de atividade. Em BNC com concentração de tirosinase semelhante (120 e 167 nM) observou-se aumento de atividade mas no caso de BNC com aproximadamente o dobro da concentração de tirosinase (320 nM) ocorreu diminuição da atividade para todos os BNCs. Estes resultados são promissores pois otimizando esta relação entre tirosinase e AuNPs, para cada razão molar, poderá levar ao aumento da atividade enzimática nos diferentes BNCs, para diferentes razões molares.

A modelação computacional da tirosinase no *software Chimera* permitiu concluir que ao valor de pH das soluções utilizadas nos estudos, a carga superficial da tirosinase é maioritariamente

negativa. Este facto dificulta a adsorção da tirosinase na superfície das AuNPs, que por sua vez são também carregadas negativamente. A funcionalização com CALNN poderá facilitar a adsorção com a tirosinase ao mimetizar a interação proteína-proteína e, como tal, ajudar a explicar a melhoria de atividade observada para BNC-CALNN de razão molar 120.

A existência de duas regiões com carga superficial positiva ou neutra, correspondentes à subunidade L, poderão ser responsáveis pela adsorção da tirosinase nas AuNPs. Uma outra zona da tirosinase, englobando regiões da subunidade H, poderá também interagir com a superfície das AuNPs. Visto esta subunidade conter o centro activo da enzima, a adsorção através desta zona poderá limitar o acesso do substrato a este mesmo centro activo.

Para BNC com uma razão molar AuNP:tirosinase de 120 foi possível verificar que a adsorção na superfície das AuNPs levou ao aumento da atividade enzimática da tirosinase. Foi também possível observar que a relação entre a concentração de tirosinase e AuNPs, para uma dada razão molar, poderá estar relacionada com aumento da atividade enzimática. Estes dois resultados são bastante promissores e encorajadores para trabalhos futuros com bionanoconjugados de tirosinase e AuNPs. A maior afinidade para o substrato e eficiência catalítica destes BNCs podem ser apelativos para aplicações como biossensores, devido à maior sensibilidade ou para a produção de compostos de valor acrescentado.

Capítulo V: Perspetivas futuras

5.1 Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos neste trabalho experimental deixam em aberto algumas perspetivas para trabalhos futuros. Visto os melhores resultados terem sido obtidos para uma razão molar de 120, onde se pôde observar uma melhoria de afinidade para o substrato e aumento da eficiência catalítica relativamente à tirosinase livre em solução, a otimização da concentração de tirosinase e AuNPs para esta razão seria um bom ponto de partida. Poderiam também ser estudadas outras razões molares, otimizando a concentração de tirosinase e AuNPs da mesma forma, de modo a ser possível concluir a melhoria da atividade enzimática estaria dependente desta relação entre concentrações. Seria também interessante estudar o efeito que o diâmetro das AuNPs teria na atividade dos BNCs

A determinação da velocidade inicial da reacção, para a obtenção de uma curva típica de cinética *Michaelis-Menten* deverá ser feita por metodologias alternativas à medição da absorvância ao comprimento de onda da formação do produto, devido à instabilidade do mesmo. A instabilidade pode levar a valores de absorvância que não correspondem aos reais, levando por sua vez a erros no ajuste dos dados experimentais e determinação dos respetivos parâmetros cinéticos. As alternativas passam pela utilização de ácido ascórbico, seguindo a oxidação do mesmo pelo decréscimo da absorvância a 265 nm que ocorre por acção da quinona formada, sendo este um método de determinação indireto, ou pelo pela utilização de MBTH, que reage com a quinona e impede-a de reagir adicionalmente. O método da oxidação do ácido ascórbico apresenta a vantagem de não necessário ser realizado a pH 4,2 [86].

Outro possível estudo futuro será a utilização de compostos inibidores e a determinação da constante de inibição K_i e estudar qual o efeito dos inibidores na atividade enzimática dos BNCs.

Após optimizados, estes BNCs poderão ter aplicações na construção de biossensores com maior sensibilidade, e como tal, limites de detecção mais baixos, algo que seria bastante interessante para a detecção de compostos fenólicos.

Bibliografia

1. Rinaldi, R., Maruccio, G., Biasco, A., Pompa, P. P., Bramanti, A., Arima, V., Visconti, P., D'Amico, S., D'Amonne, E., Cingolani, R. Bionanotechnology - Proteins to Nanodevices. *Springer*. 9-23 (2006).
2. Chan, W. C. W. Bionanotechnology progress and advances. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **12**, 87–91 (2006).
3. Baneyx, F., Park, J.-K. Editorial: Nanobio versus Bionano--what's in a name? *Biotechnol. J.* **8**, 158–9 (2013).
4. <http://www.mtbeurope.info/content/ft810001.htm>, acedido em 8/9/2014
5. <http://www.understandingnano.com/nanotech-applications.html>, acedido em 8/9/2014
6. <http://www.nanowerk.com/nanotechnology-in-cosmetics.php>, acedido em 8/9/2014
7. Reisner, D. E. Bionanotechnology II: Global Prospects. *Taylor & Francis Group*. 195-198 (2011)
8. Baptista, P. V., Doria, G., Quaresma, P., Cavadas, M., Neves, C. S., Gomes, I., Eaton, P., Pereira, E., Franco, R. Nanoparticles in molecular diagnostics. *Progress in molecular biology and translational science*. **104**, 427–88 (Elsevier Inc., 2011).
9. Doria, G., Conde, J., Veigas, B., Giestas, L., Almeida, C., Assunção, M., Rosa, J., Baptista, P. V. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors*. **12**, 1657–87 (2012).
10. Ziegler, C., Eychmuller, A. Seeded Growth Synthesis of Uniform Gold Nanoparticles with Diameters of 15 - 300 nm. *Journal of Physical Chemistry*. **115**, 4502–4506 (2011).
11. Gupta, A. K., Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
12. Song, J. Y., Jang, H.-K., Kim, B. S. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Dioplyros kaki* leaf extracts. *Process Biochem*. **44**, 1133–1138 (2009).
13. <http://www.nanotech.ucsb.edu/index.php/education/teachers/430-curad-silver>, acedido em 8/9/2014
14. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>, acedido em 8/9/2014
15. Nohynek, G. J., Lademann, J., Ribaud, C. & Roberts, M. S. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit. Rev. Toxicol.* **37**, 251–77 (2007).
16. Gergely, A., Coroyannakis, L. Nanotechnology in the EU cosmetics regulation. *household and Personal Care today*. **3**, 28–30 (2009).
17. Turkevich, J., Stevenson, P., Hillier, J. A study of the nucleation and growth processed in the synthesis of colloidal gold. (1951).

18. Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Plech, A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The journal of physical chemistry. B* **110**, 15700-7 (2006).
19. Lee, H., Lee, K., Kim, I. K., Park, T. G. Synthesis, characterization, and in vivo diagnostic applications of hyaluronic acid immobilized gold nanoprobe. *Biomaterials* **29**, 4709–18 (2008).
20. <http://nanocomposix.eu/pages/gold-nanoparticles-optical-properties>, acedido em 8/9/2014
21. Liz-Marzán, L.M. Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir* 32-41 (2006).
22. Guidelines for UV-Vis analysis - <http://nanocomposix.eu/pages/handbooks>, acedido em 8/9/2014
23. Shipway, A. N., Lahav, M., Gabai, R., Willner, I. Investigations into the Electrostatically Induced Aggregation of Au Nanoparticles. *Langmuir* **16**, 8789–8795 (2000).
24. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html>, acedido em 8/9/2014
25. Hormozi-Nezhad, M. R., Seyedhosseini, E., Robatjazi, H. Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles. *Sci. Iran.* **19**, 958–963 (2012).
26. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html#optical>, acedido em 8/9/2014
27. Shi, Y., Goodisman, J., Dabrowiak, J. C. Cyclodextrin capped gold nanoparticles as a delivery vehicle for a prodrug of cisplatin. *Inorg. Chem.* **52**, 9418–26 (2013).
28. Seoudi, R. Studies on the Effect of the Capping Materials on the Spherical Gold Nanoparticles Catalytic Activity. *World J. Nano Sci. Eng.* **01**, 51–61 (2011).
29. Kurniawan, F. New Analytical Applications of Gold Nanoparticles. (2008).
30. Lévy, R., Thanh, N. T. K., Doty, R. C., Hussain, I., Nichols, R. J., Schiffrin, D. J., Brust, M., Fernig, D. G. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10076–84 (2004).
31. Gole, A., Dash, C., Ramakrishnan, V., Sainkar, S.R., Mandale, A. B., Rao, M., Sastry, M. Pepsin - Gold Colloid Conjugates : Preparation , Characterization , and Enzymatic Activity. *Langmuir.* **17**, 1674–1679 (2001).
32. Wu, C.-S., Wu, C.-T., Yang, Y.-S., Ko, F.-H. An enzymatic kinetics investigation into the significantly enhanced activity of functionalized gold nanoparticles. *Chem. Commun.* 5327–9 (2008).
33. Katz, E., Willner, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 6042–108 (2004)

34. Aubin-Tam, M.-E. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates: towards a strategy for optimizing the interface. *Massachusetts Institute of Technology* (2008)
35. Petkova, G. a, Záruba, C. K. C., Zvátora, P., Král, V. Gold and silver nanoparticles for biomolecule immobilization and enzymatic catalysis. *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 287 (2012).
36. Wang, P. Nanoscale biocatalyst systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 574–9 (2006).
37. Jia, H., Zhu, G. & Wang, P. Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 406–14 (2003).
38. Ardao, I., Comenge, J., Benaiges, M. D., Álvaro, G. & Puentes, V. F. Rational nanoconjugation improves biocatalytic performance of enzymes: aldol addition catalyzed by immobilized rhamnulose-1-phosphate aldolase. *Langmuir* **28**, 6461–7 (2012).
39. Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A., Linse, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2050–5 (2007).
40. Rahman, M. *et al.* Protein-Nanoparticle Interactions. *Biophysics* **15**, 21–44 (2013)
41. Lv, M., Zhu, E., Su, Y., Li, Q., Li, W., Zhao, Y., Huang, Q. Trypsin-gold nanoparticle conjugates: binding, enzymatic activity, and stability. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **39**, 429–38 (2009).
42. Fujiwara, K., Watarai, H., Itoh, H., Nakahama, E. & Ogawa, N. Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 639–44 (2006).
43. Xie, T. *et al.* Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. *African Journal of Biotechnology.* **8**, 4724–4733 (2009).
44. Vidotti, M., Carvalhal, R. F., Mendes, R. K., Ferreira, D. C. M. & Kubota, L. T. Biosensors Based on Gold Nanostructures. *J. Braz. Chem. Soc.* **22**, 3–20 (2011).
45. Zhang, S., Wang, N., Yu, H., Niu, Y. & Sun, C. Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor. *Bioelectrochemistry* **67**, 15–22 (2005).
46. Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P. & González-Cortés, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* **53**, 5848–5866 (2008).
47. Newman, J. D. & Turner, A. P. F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2435–53 (2005).
48. Cortez, J. Vorobieva, E., Gralheira, D., Osório, I., Soares, L., Vale, N., Pereira, E., Gomes, P., Franco, R. Bionanoconjugates of tyrosinase and peptide-derivatised gold nanoparticles for biosensing of phenolic compounds. *J. Nanoparticle Res.* **13**, 1101–1113 (2010).
49. Liu, S., Yu, J. & Ju, H. Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode. *J. Electroanal. Chem.* **540**, 61–67 (2003).

50. Janegitz, B. C., Medeiros, R. a., Rocha-Filho, R. C. & Fatibello-Filho, O. Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode. *Diam. Relat. Mater.* **25**, 128–133 (2012).
51. Ambrosi, A., Airò, F. & Merkoçi, A. Enhanced gold nanoparticle based ELISA for a breast cancer biomarker. *Anal. Chem.* **82**, 1151–6 (2010).
52. Jeong, E. H., Jung, G., Hong, C. A. & Lee, H. Gold nanoparticle (AuNP)-based drug delivery and molecular imaging for biomedical applications. *Arch. Pharm. Res.* **37**, 53–9 (2014).
53. Duncan, B., Kim, C. & Rotello, V. M. Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *J. Control. Release* **148**, 122–7 (2010).
54. Dreaden, E. C., Austin, L. a, Mackey, M. a & El-Sayed, M. a. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Ther. Deliv.* **3**, 457–78 (2012).
55. Li, J., Gupta, S. & Li, C. Research perspectives: gold nanoparticles in cancer theranostics. *Quant. Imaging Med. Surg.* **3**, 284–91 (2013).
56. Doria, G., Conde, J., Veigas, B., Giestas, L., Almeida, C., Assunção, M., Rosa, J., Baptista, P. V. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors.* **12**, 1657–87 (2012).
57. Kawamura-Konishi, Y., Tsuji, M., Hatana, S., Asanuma, M., Kakuta, D., Kawano, T., Mukouyama, E. B., Goto, H., Suzuki, H. Purification, characterization, and molecular cloning of tyrosinase from *Pholiota nameko*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1752–60 (2007).
58. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/8/t3824dat.pdf>, acedido em 31/8/2013
59. Ismaya, W. T., Rozeboom, J., Weijn, A., Mes, J. J. & Fusetti, F. Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochemistry.* **50**, 5477–5486 (2011).
60. *Software ChemDraw Ultra 11*
61. Kong, K. H., Hong, M. P., Choi, S. S., Kim, Y. T. & Cho, S. H. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31** (Pt 2), 113–8 (2000).
62. Solomon, E. I., Sundaram, U. M. & Machonkin, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563–2606 (1996).
63. Khalafi, L., Rafiee, M., Shahbak, M. & Shirmohammadi, H. Kinetic Study of the Oxidation of Catechols in the Presence of N-Methylaniline. *J. Chem.* **2013**, 1–5 (2013).
64. Michałowicz, J. & Duda, W. Phenols – Sources and Toxicity. *Polish J. of Environ.* **16**, 347–362 (2007).
65. Li, G., Zhang, H., Sader, F., Vadhavkar, N. & Njus, D. Oxidation of 4-methylcatechol: implications for the oxidation of catecholamines. *Biochemistry* **46**, 6978–83 (2007).

66. García-Borrón, J. C. & Solano, F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* **15**, 162–73 (2002).
67. Jaenicke, E. & Decker, H. Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem. J.* **371**, 515–23 (2003).
68. Kim, J.-J. & Kim, W.-Y. Purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh ginseng. *J. Ginseng Res.* **37**, 117–23 (2013).
69. González, A. G., González Ureña, Á., Lewis, R. J. & van der Zwan, G. Spectroscopy and kinetics of tyrosinase catalyzed trans-resveratrol oxidation. *J. Phys. Chem. B* **116**, 2553–60 (2012).
70. Olivares, C. & Solano, F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 750–60 (2009).
71. Gasparetti, C., Nordlund, E., Jänis, J., Buchert, J. & Kruus, K. Extracellular tyrosinase from the fungus *Trichoderma reesei* shows product inhibition and different inhibition mechanism from the intracellular tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 598–607 (2012).
72. Chang, T.-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2440–75 (2009).
73. Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M. & Lomascolo, a. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 219–32 (2006).
74. Espín, J. C., Jolivet, S. & Wichers, H. J. Kinetic study of the oxidation of gamma-L-glutaminy-4-hydroxybenzene catalyzed by mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3495–502 (1999).
75. Falguera, V., Gatiús, F., Pagán, J. & Ibarz, A. Kinetic analysis of melanogenesis by means of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Food Res. Int.* **43**, 1174–1179 (2010).
76. Pérez-Gilabert, M. Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Sci.* **166**, 365–370 (2004).
77. UCSF Chimera 1.8rc, acedido em <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>
78. Land, E. J., Ramsden, C. a & Riley, P. a. Quinone chemistry and melanogenesis. *Methods Enzymol.* **378**, 88–109 (2004).
79. Sanjust, E., Cecchini, G., Sollai, F., Curreli, N. & Rescigno, A. 3-Hydroxykynurenine as a substrate/activator for mushroom tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **412**, 272–278 (2003).
80. Labus, K., Turek, A., Liesiene, J. & Bryjak, J. Efficient *Agaricus bisporus* tyrosinase immobilization on cellulose-based carriers. *Biochem. Eng. J.* **56**, 232–240 (2011).
81. Land, E. J., Ramsden, C. a & Riley, P. a. The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: a substrate structure investigation. *Tohoku J. Exp. Med.* **212**, 341–8 (2007).
82. Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H. J., Pellon, G. *Agaricus bisporus* browning : a review. *Mycol. Res.* **102**, 1459–1483 (1998).

83. Haghbeen, K. & Wue Tan, E. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Anal. Biochem.* **312**, 23–32 (2003).
84. Li, J. Y., Christensen, B. M. & Tracy, J. W. Electrochemical determination of diphenol oxidase activity using high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **190**, 354–9 (1990).
85. Yildiz, H. B., Freeman, R., Gill, R. & Willner, I. Piezoelectric Analysis of Tyrosinase Activity by Functionalized Nanoparticles. *Anal. Chem.* **80**, 2811–2816 (2008).
86. Winder, A. J., Harris, H. New assays for the hydroxylase and dop oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **198**, 317–326 (1991).
87. Seo, S.-Y., Sharma, V. K. & Sharma, N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2837–53 (2003).
88. Faria, R. O., Rotuno, M., Amazonas, M. A. L. A., Krieger, N. Mitchell, D. A. The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 287–294 (2007).
89. Morales, M. D., Morante, S., Escarpa, A., González, M. C., Reviejo, A. J., Pingarrón, J. M. Design of a composite amperometric enzyme electrode for the control of the benzoic acid content in food. *Talanta* **57**, 1189–98 (2002).
90. Bailey, A. M., Collopy, P. D., Thomas, D. J., Sergeant, M. R., Costa, A. M. S. B., Barker, G. L. A., Mills, P. R., Challen, M. P., Foster, G. R. Transcriptomic analysis of the interactions between *Agaricus bisporus* and *Lecanicillium fungicola*. *Fungal Genet. Biol.* **55**, 67–76 (2013).
91. Wang, K.-H., Lin, R. L., Hsu, F., Huang, Y., Chang, H., Huang, C., Lee, M. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 353–9 (2006).
92. Selinheimo, E., NiEidhin, D., Steffensen, Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaouli, S., Record, E., O'Beirne, D., Buchert, J., Kruus, K. Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J. Biotechnol.* **130**, 471–80 (2007).
93. Lezzi, C., Bleve, G., Spagnolo, S., Perrotta, C. & Grieco, F. Production of recombinant *Agaricus bisporus* tyrosinase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 1875–80 (2012).
94. Selinheimo, E., Autio, K., Kruus, K. & Buchert, J. Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 6357–65 (2007).
95. Freddi, G., Anghileri, A., Sampaio, S., Buchert, J., Monti, P., Taddei, P. Tyrosinase-catalyzed modification of *Bombyx mori* silk fibroin: grafting of chitosan under heterogeneous reaction conditions. *J. Biotechnol.* **125**, 281–94 (2006).
96. Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomás-Barberán, F. a & Wichers, H. J. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1187–93 (2001).

97. Yildiz, H. B., Caliskan, S., Kamaci, M., Caliskan, A. & Yilmaz, H. L-Dopa synthesis catalyzed by tyrosinase immobilized in poly(ethyleneoxide) conducting polymers. *Int. J. Biol. Macromol.* **56**, 34–40 (2013).
98. Upstone, S. L. Ultraviolet / Visible Light Absorption Spectrophotometry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 1699–1714 (2000).
99. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-quantitation/bicinchoninic-acid-kit.html>, acedido em 9/9/2014
100. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Anal. Chem.* **79**, 4215–21 (2007).
101. Protein electrophoresis - Technical manual. *Amersham Biosciences*
102. Rogers, A. & Gibon, Y. Plant Metabolic Networks. *Springer*. 71-103 (2009).
103. Raymond, C. Physical Chemistry for the Biosciences. *University Science Books*. 363-400 (2005)
104. Espín, J. C. *et al.* Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1270–9 (2000).
105. Behbahani, I. *et al.* A comparison of Mushroom Tyrosinase Dopachrome and Dopachrome Assays Using Diode-Array Spectrophotometry: Dopachrome Formation vs Ascorbate-Linked Dopachrome Reduction. *Microchemical Journal*. **47**, 251-260 (1993)
106. Muñoz, J. L. *et al.* Calculating molar absorptivities for quinones: application to the measurement of tyrosinase activity. *Anal. Biochem.* **351**, 128–38 (2006).
107. Waite, J. H. Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-quinones. *Anal. Biochem.* **75**, 211–8 (1976).
108. Muñoz-Muñoz, J. L. *et al.* Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: kinetics and mechanism. *Biochem. J.* **416**, 431–40 (2008).
109. Dolinsky, T. J. *et al.* PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Research*. **35**, 522-525 (2007)
110. Dolinsky, T. J. *et al.* PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research*. **32**, 665-667 (2004)
111. Baker, N. A. *et al.* Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**, 10037-10041 (2001)
112. Fernandez-Lafuente, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb. Technol.* **45**, 405–418 (2009).
113. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/2/tyrosinase.pdf, acedido em 31/9/2013

114. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/General_Information/tyrosinase_polyphenol_oxidase.pdf, acedido em 31/9/2013

Apêndice

I. Protocolos para determinação da atividade específica da tirosinase ^[113,114]

Enzymatic Assay of TYROSINASE (EC 1.14.18.1)

PRINCIPLE:

L-Tyrosine + O₂ $\xrightarrow{\text{Tyrosinase}}$ L-DOPA

L-DOPA $\xrightarrow{\text{Tyrosinase}}$ L-DOPA-quinone + H₂O

Abbreviation used:

L-DOPA = L-3,4-Dihydroxyphenylalanine

CONDITIONS: T = 25°C, pH = 6.5, A_{280nm}, Light path = 1 cm

METHOD: Continuous Spectrophotometric Rate Determination

REAGENTS:

- A. 50 mM Potassium Phosphate Buffer, pH 6.5 at 25°C
(Prepare 50 ml in deionized water using Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous, Sigma Prod. No. P-5379. Adjust to pH 6.5 at 25°C with 1 M KOH.)
- B. 1 mM L-Tyrosine Solution
(Prepare 100 ml in deionized water using L-Tyrosine, Free Base, Sigma Prod. No. T-3754.)
- C. Tyrosinase Enzyme Solution
(Immediately before use, prepare a solution containing 500 - 1,000 units/ml of Tyrosinase in cold Reagent A.)

PROCEDURE:

Prepare a reaction cocktail by pipetting (in milliliters) the following reagents into a suitable container:

Deionized Water	9.00
Reagent A (Buffer)	10.00
Reagent B (Tyrosine)	10.00

Mix and adjust to pH 6.5 at 25°C with 1 M HCl or 1 M NaOH, if necessary. Immediately before use, oxygenate by bubbling 99.9% pure O₂ through the reaction cocktail for 3 to 5 minutes. Pipette (in milliliters) into suitable quartz cuvettes:¹

	<u>Test</u>	<u>Blank</u>
Reaction Cocktail	2.90	2.90

Equilibrate to 25°C. Monitor the A_{280nm} until constant, using a suitably thermostatted spectrophotometer. Then add:

Reagent A (Buffer)	-----	0.10
Reagent C (Enzyme Solution)	0.10	-----

Immediately mix by inversion and record the increase in A_{280nm} for approximately 10 minutes. Obtain the $\Delta A_{280nm}/\text{minute}$ using the maximum linear rate for both the Test and Blank.

CALCULATIONS:

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{(\Delta A_{280\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{280\text{nm}}/\text{min Blank}) (df)}{(0.001) (0.1)}$$

df = Dilution factor

0.001 = The change in $A_{280\text{nm}}$ /minute per unit of Tyrosinase
at pH 6.5 at 25°C in a 3 ml reaction mix

0.1 = Volume (in milliliters) of enzyme used

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

UNIT DEFINITION:

One unit will cause an increase in $A_{280\text{nm}}$ of 0.001 per
minute at pH 6.5 at 25°C in a 3 ml reaction mix containing

L-tyrosine.

FINAL ASSAY CONCENTRATION:

In a 3.00 ml reaction mix, the final concentrations are
18 mM potassium phosphate, 0.3 mM L-tyrosine and
50 - 100 units tyrosinase.

REFERENCE:

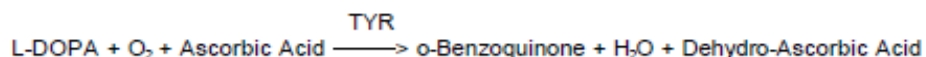
Duckworth, H. W. and Coleman, J. E. (1970) *J. Biol. Chem.*
245, 1613-1625

NOTES:

1. Final volume of all cuvettes must equal 3 ml as stated in the Unit Definition.
2. This assay is based on the cited reference.
3. Where Sigma Product or Stock numbers are specified, equivalent reagents may be substituted.

Enzymatic Assay of TYROSINASE
Polyphenol Oxidase Activity
(EC 1.14.18.1)

PRINCIPLE:



Abbreviations used:

TYR = Tyrosinase

L-DOPA = L-3,4-Dihydroxyphenylalanine

CONDITIONS: T = 25°C, pH 6.5, $A_{259\text{nm}}$, Light path = 1 cm

METHOD: Continuous Spectrophotometric Rate Determination

REAGENTS:

- A. 50 mM Potassium Phosphate Buffer, pH 6.5 at 25°C
(Prepare 100 ml in deionized water using Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous, Prod. No. P-5379. Adjust to pH 6.5 at 25°C with 1 M NaOH.)
- B. 5.0 mM L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
(Prepare 10 ml in Reagent A using L-3,4-Dihydroxyphenylalanine, Prod. No. D-9628.)
- C. 2.1 mM Ascorbic Acid Solution
(Prepare 10 ml in Reagent A using L-Ascorbic Acid, Sodium Salt, Prod. No. A-7631. **PREPARE FRESH.**)
- D. 0.065 mM Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)
(Prepare 10 ml in Reagent A using Ethylenediaminetetraacetic Acid, Disodium, Dihydrate Salt, Stock No. ED2SS.)
- E. Tyrosinase Enzyme Solution (PPO)
(Immediately before use, prepare a solution containing 500 - 1000 u/ml Tyrosinase in Reagent A.)

PROCEDURE:

Pipette (in milliliters) the following reagents into suitable quartz cuvettes:

	<u>Test</u>	<u>Blank</u>
Reagent A (Buffer)	2.60	2.80
Reagent B (L-DOPA)	0.10	0.10
Reagent C (Ascorbic Acid)	0.10	—
Reagent D (EDTA)	0.10	0.10

Mix by inversion and equilibrate to 25°C. Monitor the $A_{259\text{nm}}$ until constant, using a suitably thermostatted spectrophotometer. Then add:

Reagent E (TYR)	0.10	—
-----------------	------	---

Immediately mix by inversion and record the decrease in $A_{259\text{nm}}$ for approximately 5 minutes. Obtain the $\Delta A_{259\text{nm}}/\text{minute}$ using the maximum linear rate for both the Test and Blank.

CALCULATIONS:

$$\text{Units/mg enzyme} = \frac{(\Delta A_{265\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{265\text{nm}}/\text{min Blank})(\text{df})}{(0.001)(0.1)}$$

0.001 = The change in $A_{265\text{nm}}/\text{min}$ per unit of polyphenol oxidase in a 3.0 ml reaction mixture at pH 6.5 at 25°C.

0.1 = Volume (in milliliter) of enzyme used

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

UNIT DEFINITION:

One unit is equal to a $\Delta A_{265\text{nm}}$ of 0.001 per min at pH 6.5 at 25°C in 3 ml reaction mix containing L-DOPA and L-ascorbic acid.

FINAL ASSAY CONCENTRATION:

In a 2.92 ml reaction mix, the final concentrations are 50 mM potassium phosphate, 0.17 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine, 0.072 mM ascorbic acid, .0022 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 50 - 100 units of tyrosinase.

NOTES:

1. All products and stock numbers, unless otherwise indicated, are Sigma product and stock numbers.

Enzymatic Assay of TYROSINASE
Catechol Oxidase Activity
(EC 1.14.18.1)

PRINCIPLE:

Catechol + Ascorbic Acid $\xrightarrow{\text{Catechol Oxidase}}$ Dehydro-Ascorbic Acid + o-Benzoquinone

CONDITIONS: T = 25°C, pH = 6.5, A_{265nm} , Light path = 1 cm

METHOD: Continuous Spectrophotometric Rate Determination

REAGENTS:

- A. 50 mM Potassium Phosphate Buffer, pH 6.5 at 25°C
 (Prepare 100 ml in deionized water using Potassium Phosphate, Monobasic, Anhydrous, Prod. No. P-5379. Adjust to pH 6.5 at 25°C with 2 M NaOH.)
- B. 5.0 mM Catechol Solution (Catechol)
 (Prepare 10 ml in Reagent A using Catechol, Prod. No. C-9510.)
- C. 2.1 mM Ascorbic Acid Solution (Asc Acid)
 (Prepare 10 ml in Reagent A using L-Ascorbic Acid, Sodium Salt, Prod. No. A-7631. **PREPARE FRESH.**)
- D. 0.065 mM Ethylenediaminetetraacetic Acid Solution (EDTA)
 (Prepare 10 ml in Reagent A using Ethylenediaminetetraacetic Acid, Disodium Salt, Dihydrate, Stock No. ED2SS.)
- F. Tyrosinase Enzyme Solution
 (Immediately before use, prepare a solution containing 500 -1000 units/ml of Tyrosinase in Reagent A.)

PROCEDURE:

Pipette (in milliliters) the following reagents into suitable quartz cuvettes:

	<u>Test</u>	<u>Blank</u>
Reagent A (Buffer)	2.60	2.80
Reagent B (Catechol)	0.10	0.10
Reagent C (Asc Acid)	0.10	-----
Reagent D (EDTA)	0.10	0.10

Mix by inversion and equilibrate to 25°C. Monitor the A_{265nm} until constant, using a suitably thermostatted spectrophotometer. Then add:

Reagent F (Enzyme Solution)	0.10	-----
-----------------------------	------	-------

Immediately mix by inversion and record the decrease in A_{265nm} for approximately 5 minutes. Obtain the ΔA_{265nm} using the maximum linear rate for both the Test and Blank.

CALCULATIONS:

$$\text{Units/mg enzyme} = \frac{\Delta A_{265\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{265\text{nm}}/\text{min Blank}}{(0.001) (\text{mg enzyme/RM})}$$

0.001 = The change in $A_{265\text{nm}}$ per unit of Tyrosinase in a 3.00 ml reaction mixture at pH 6.5 at 25°C.

RM = Reaction Mix

UNIT DEFINITION:

One unit is equal to a $\Delta A_{265\text{nm}}$ of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25°C in a 3 ml reaction mix containing catechol and L-ascorbic acid.

FINAL ASSAY CONCENTRATION:

In a 3.00 ml reaction mix, the final concentrations are 50 mM potassium phosphate, 0.17 mM catechol, 0.070 mM L-ascorbic acid, 0.0022 mM EDTA, and 50 - 100 units of catechol oxidase.

REFERENCE:

Kandaswami, C. and Vaidyanathan, C.S. (1973) *Journal of Biological Chemistry* **248**, 4035.

NOTES:

1. This assay is a modification of the procedure cited in the above reference.
2. All products and stock numbers, unless otherwise indicated, are Sigma product and stock numbers.

II.

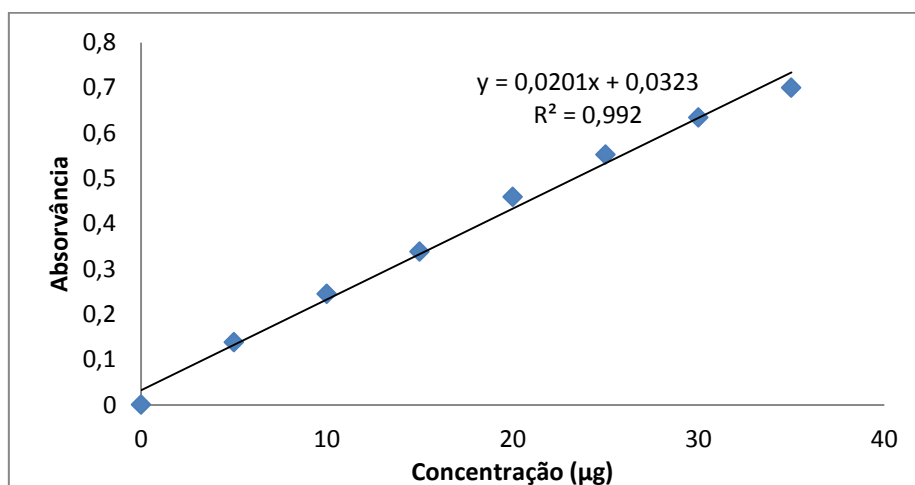


Figura 5.1 - Reta de calibração para determinação de proteína pelo método de BCA.

Tabela 5.1 – Valores de absorvância e concentração da nova solução *stock* de tirosinase.

Absorvância da amostra	Concentração (mg/mL)
0,652	1,54
0,659	1,56

III.

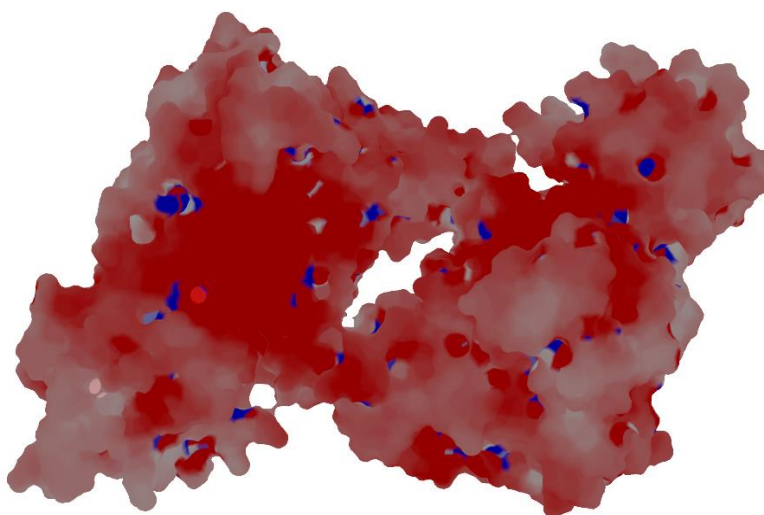


Figura 5.2 - Imagem frontal da estrutura tridimensional da enzima tirosinase de *Agaricus bisporus*, com base na estrutura cristalográfica depositada com o código PDB 2y9w. A imagem foi preparada utilizando o *software Chimera* ^[77] e utilizando a ferramenta APBS ^[111] para colorir a superfície.

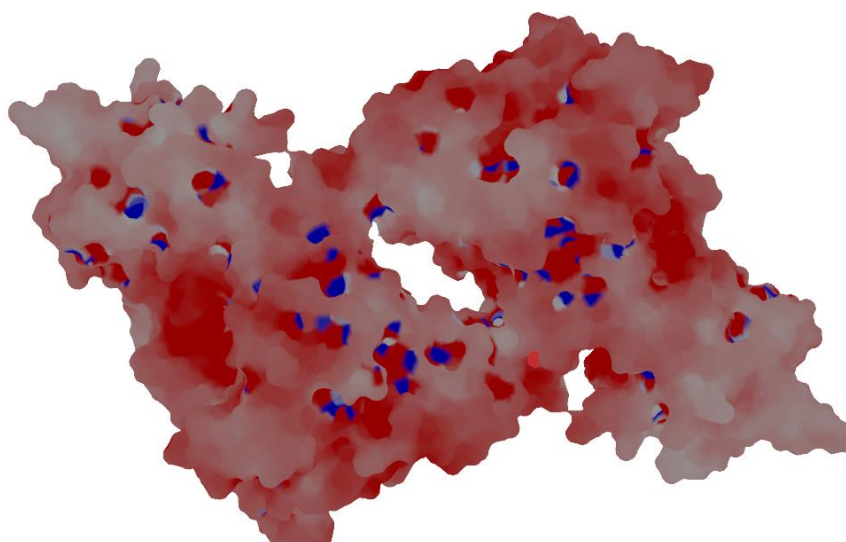


Figura 5.3 - Imagem da estrutura tridimensional da enzima tirosinase de *Agaricus bisporus* vista por trás, com base na estrutura cristalográfica depositada com o código PDB 2y9w. A imagem foi preparada utilizando o *software Chimera* ^[77] e utilizando a ferramenta APBS ^[111] para colorir a superfície.